

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

LABORATOIRE DE PHARMACOGNOSIE
ET DE PHARMACIE GALÉNIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES

PROFESSEUR : A. MIRIMANOFF

Contribution
à l'étude de l'action pharmacologique
du lupulin sur *Carassius Auratus*

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Pierre Etienne GRUMBACH

de Belmont sur Lausanne (Suisse)

Pharmacien diplômé

Thèse N° 1266

NYON

IMPRIMERIE TH. MUHLETHALER S. A.

1957

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

LABORATOIRE DE PHARMACOGNOSIE
ET DE PHARMACIE GALÉNIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES

PROFESSEUR : A. MIRIMANOFF

**Contribution
à l'étude de l'action pharmacologique
du lupulin sur *Carassius Auratus***

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
PAR

Pierre Etienne GRUMBACH

de Belmont sur Lausanne (Suisse)
Pharmacien diplômé

Thèse N° 1266



NYON
IMPRIMERIE TH. MUHLETHALER S. A.
1957

La faculté des Sciences, sur le préavis de Monsieur le professeur A. MIRIMANOFF autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 mars 1957

*Le doyen:
Fernand CHODAT*

Thèse n° 1266

*Que Monsieur le Professeur André Mirimanoff veuille
bien trouver ici l'hommage de ma profonde gratitude pour
l'intérêt qu'il n'a cessé de porter à ce travail entrepris sous
sa direction.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A mon très cher père,

A ma très chère femme.

INTRODUCTION

Les effets thérapeutiques attribués jadis au lupulin et au houblon dont il provient étaient des plus variés.

On leur reconnaissait des propriétés abortives, apéritives, cholagogues, diurétiques, sédatives et même diététiques, puisque les jeunes pousses superflues des cultures de houblon étaient comestibles à la façon des asperges, dont elles possèdent la consistance molle et parenchymateuse.

Les cônes de houblon sont encore utilisés, en France notamment, pour la préparation d'une tisane amère, prétendument tonique, apéritive, légèrement laxative et anaphrodisiaque.

Que dire de toutes ces vertus, sinon qu'aucune d'entre elles n'a fait, chez l'homme, l'objet de contrôles cliniques approfondis. Pour certaines de ces vertus, nous en sommes réduits à des présomptions, tandis que d'autres, comme les vertus abortives ou cholagogues, ne reposent sur aucun indice valable.

Les propriétés apéritives, encore que de peu d'intérêt, se conçoivent grâce à l'amertume des préparations de houblon. Les propriétés diurétiques sont liées à l'élimination de liquide consécutive à la consommation de toute infusion et surtout à la présence de nitrate de potassium, constituant naturel des terrains de culture ou puisé par la plante dans l'engrais mis à sa disposition.

Récemment l'activité antiseptique *in vitro* des acides amers du houblon a été bien décrite¹; elle retient encore actuellement la plupart des recherches consacrées au houblon^{2, 3, 4}.

Le présent travail a pour objet de confirmer sur un animal d'expérience l'action prétendument sédative du lupulin, dont la littérature relative au houblon fait largement état.

Un important indice est fourni par le besoin de sommeil qu'éprouvent les cueilleuses de cônes de houblon. Cette tendance à la somnolence paraît d'autant plus forte que l'on est moins habitué à travailler le houblon.

C'est par ces modestes observations que fut étayée l'hypothèse relative à l'influence hypnogène des huiles essentielles volatiles du houblon.

Schulz⁵ rapproche cette observation de l'habitude, encore en usage aujourd'hui dans certaines régions, de placer sur l'oreiller des sachets de cônes séchés de houblon en guise de soporifique.

Des constatations analogues incitent Groenberg⁶ à considérer le houblon comme un somnifère doux, d'action durable, dépourvu de manifestations secondaires.

O. Gessner ⁷ voit dans les substances amères du houblon des sédatifs et hypnogènes dont l'action est évidente sur l'animal mais nulle, même à fortes doses, chez l'homme. L'huile essentielle lui paraît par contre d'une certaine efficacité sédative chez l'homme.

Steidle ⁸, après avoir expérimenté sur des pigeons, des grenouilles, des poules et des chiens, conclut que l'efficacité des houblons varie considérablement selon la provenance et la récolte et qu'elle diminue notablement avec la durée de magasinage.

Sikorski ⁹, en travaillant sur des pigeons et des moineaux, constate une action sédative due selon lui aux substances amères qu'il rend également responsables de manifestations toxiques telles qu'excitation puis paralysie de la respiration. Pour Sikorski, l'huile essentielle ne possède pas d'action sédative.

Aune Staven-Grönberg ¹⁰ montra que des extraits de houblon et le lupulinate de sodium réduisaient chez l'animal d'expérience l'excitabilité du système nerveux et provoquaient une narcose profonde.

Neumann ¹¹ ne put faire de constatations identiques chez le lapin, par contre chez le rat il observe une nette sédation.

En résumé, les avis des auteurs sont contradictoires : Bohn ¹², Gessner ¹³, Tschirch ¹⁴, Schulz ¹⁵, Kahnt ¹⁶, Bremgart ¹⁷ attribuent une action sédative à l'huile essentielle de lupulin, tandis que Steidle ¹⁸ et Sikorski ¹⁹ prouvent par leurs expériences que l'effet sédatif n'est pas dû à l'huile essentielle mais aux acides amers du houblon.

Quant à E. Poulsson ²⁰, il nie toute action du houblon ou du lupulin sur l'individu.

Une telle divergence dans les résultats exprimés est encore aujourd'hui inexplicable. Peut-être faut-il en trouver la cause dans les différences d'âge et d'origine de la drogue utilisée ? Rappelons que des houblons d'origines différentes peuvent avoir les teneurs les plus diverses en principes actifs.

Peut-être à propos des expériences entreprises faut-il parler de susceptibilité d'espèce à l'égard de la drogue en rapport avec les différentes catégories d'animaux utilisés ?

Quant aux divergences relatives à l'action sur l'homme, peut-être résultent-elles d'une susceptibilité individuelle vis-à-vis de la drogue ?

L'absence de contrôles cliniques chez l'homme, les descriptions incomplètes données par les auteurs sur l'origine et l'âge de la drogue utilisée pour les différentes préparations ne nous permettent pas de sortir du domaine hypothétique.

1. Description du houblon et du lupulin

Le lupulin est une poudre jaune à brun doré, constituée de glandes détachées par battage des cônes ou strobiles de houblon (*Humulus lupulus*).

On sait que le houblon est une plante dioïque, herbacée, grimpante et vivace, à tige annuelle volubile. La botanique systématique classe le houblon dans la famille des Cannabinacées. Le houblon, dont l'origine probable est l'Asie, pousse actuellement à l'état sauvage ou cultivé dans toute l'Europe où il est d'ailleurs introduit depuis plusieurs siècles.

Le houblon sauvage est très répandu dans les zones tempérées de l'Ancien et du Nouveau-Monde.

Les endroits un peu humides, les prairies au voisinage des rivières, les aunaies, la lisière des bois, les haies constituent son habitat de prédilection. Il est très sensible à la sécheresse, mais redoute l'excès d'humidité qui empêche l'aération du terrain.

Croissant avant tout en plaine, on le trouve néanmoins en Europe centrale jusqu'à l'altitude de 1500 m.

L'Angleterre, la Belgique, l'Allemagne, le nord et l'est de la France, l'Autriche, la Tchécoslovaquie, la Yougoslavie, la Suisse, la Pologne, possèdent d'importantes cultures de houblon. On en trouve également en Amérique du Nord, au Brésil et en Australie. Il existe en Suisse²¹ cinq cultures de houblon, ce sont : Hüttwilen (TC), Schlattigen (TC), Thalheim (ZH), Sulz-Rickenbach (ZH), et Hörhausen (TC). Les cultures de houblon étaient en 1952 trente fois plus étendues en Suisse qu'en 1935. D'après la *Revue internationale d'agriculture de Rome*²², la superficie mondiale des cultures de houblon était en 1947 évaluée à 52.660 ha. donnant 52.000 t. de cônes secs.

Le houblon cultivé se distingue peu du houblon sauvage, sa croissance est cependant plus robuste et ses cônes, plus petits qu'à l'état sauvage, sont richement pourvus des organes glandulaires jaune orange caractéristiques du lupulin. La production du lupulin confère toute sa valeur aux pieds femelles seuls utilisés, car les pieds mâles sont pratiquement dépourvus de ces organes glandulaires. C'est la raison pour laquelle les cultivateurs de houblon éliminent systématiquement tous les pieds mâles dans le voisinage des champs de houblon.

Les pousses de houblon sont annuelles, mais le houblon ne produit sa première récolte que deux ou trois ans après avoir été semé. La génétique du houblon est encore mal connue, c'est pourquoi on le multiplie par boutures. On obtient ainsi des variétés pures. Le tronçon souterrain de la plante se compose, chez les sujets âgés, de la partie considérablement épaissie qui a servi de bouture, des parties, épaisses également, d'où partent les rejets, et d'un système racinaire important. Des racines très vigoureuses se détachent du tronçon de plante utilisé lors du marcottage et pénètrent profondément en terre, tandis que la partie souterraine des nouveaux rejets étale en surface les plus fines racines, mais seulement au moment de la floraison, où apparaissent dans l'humus, avec une rapidité incroyable, de nombreuses radicules : le planteur appelle cette période « la pilosité ».

Les pousses souterraines sont le siège de nombreux bourgeons d'où partiront au printemps, chaque année, les pousses grimpantes. Ces pousses,

dont l'extrémité recourbée rappelle un crochet, se fraient un passage au travers du sol. Sitôt parvenues à la lumière, elles se colorent en rouge pour verdir par la suite.

Les jeunes pousses croissent rapidement, alors que le développement du feuillage intervient tardivement. Durant cet intervalle, la partie terminale des tiges reste nue.

La nature ne fait pas les choses au hasard, car cette disposition facilite grandement les mouvements de croissance que les pousses exécutent pour trouver un support. L'extrémité des tiges, fortement inclinée au point d'être presque horizontale, décrit des mouvements de circumnutation. Ces mouvements se font dans le sens des aiguilles d'une montre, à une vitesse à peu près égale, de sorte qu'en cas de conditions de croissance favorables, l'extrémité de la tige met une heure pour accomplir une révolution complète.

Cette nutation a pour effet de permettre à l'extrémité de la tige d'explorer le milieu environnant et d'enlacer le premier objet du voisinage avec lequel elle prend contact, pour autant qu'il soit propre à lui servir de support. Comme tels ne sont pris en considération que des objets dressés en l'air et de diamètre réduit. On constate que la tige ne s'accroche pas à un support trop incliné et dont le diamètre dépasse 10 cm.

La tige anguleuse s'applique fortement contre le tuteur choisi grâce à ses arêtes pourvues de six rangées de poils adhésifs très rigides, dont l'extrémité figure un crochet à deux pointes en forme d'enclume. C'est au moment où la tige est fixée dans sa position normale que les feuilles, siégeant par paires au niveau des nœuds, se déploient. La plante mesure alors environ 2 m.

Les feuilles sont palmées à trois ou cinq lobes, recouvertes sur leur face supérieure de poils courts et pointus ; elles sont comme la tige rugueuses au toucher, d'autant plus que les nervures de la face inférieure sont partiellement pourvues de poils adhésifs.

A la fin de sa croissance, la plante atteint 4 à 6 m. de haut ; apparaissent alors les fleurs.

La plante mâle a des inflorescences en forme de grappes composées, situées à l'extrémité des tiges et notamment à l'aisselle des feuilles.

Les fleurs sont petites, longues seulement de 3 mm. Leur péricône est formé de cinq pièces vert pâle, libres entre elles, et de cinq anthères, à glandes résineuses, portées par un filet très court.

Les inflorescences femelles apparaissent tout d'abord en épis, semblables à des chatons verts et peu visibles, dont le développement rapide forme ensuite les cônes caractéristiques du houblon. Les cônes rappellent ceux du mélèze par leur forme et leurs dimensions, mais ils restent mous et de couleur vert pâle.

Les inflorescences femelles sont abondantes sur les rameaux latéraux où elles se développent isolément ou en touffes. La partie inférieure de la plante, à peu près jusqu'à hauteur d'homme, reste le plus souvent dépourvue de fleurs. Ce fait n'a pas échappé aux cultivateurs qui coupent habituellement les rameaux inférieurs, vraies pousses gourmandes, pour obtenir

une ramification et des inflorescences plus riches dans les parties supérieures de la plante dont le rendement est ainsi élevé.

La conformation d'une inflorescence femelle n'est pas aisément discernable. Au point de vue botanique, il s'agit de deux inflorescences en cymes unipares scorpioïdes, mais cependant si courtes que les quatre fleurs semblent se trouver au même niveau. Chaque fleur est recouverte par une bractéole spéciale, fixée au petit pétiole floral. Les bractéoles deviennent aussi grosses que les stipules, l'un de leurs bords est replié à la base et leur donne ainsi la forme d'une oreille. Dans le pli ainsi formé, on découvre la minuscule fleur femelle, composée d'un pistil, de deux stigmates ciliciformes, riches en papilles, et d'un involucre caliciforme, le périgone, dans lequel l'ovaire est presque entièrement inclus.

Etant donné que chaque paire de stipules porte quatre fleurs, recouverte chacune par une bractée, il en résulte que le nombre des bractées est double de celui des stipules. Ce fait a son importance, car pour les cultivateurs les bractées représentent les parties les plus précieuses du houblon. Toute la partie inférieure de la face externe des bractées est en effet parsemée de gros organes glandulaires globuleux luisants, jaune orange.

Le côté interne des bractées est dépourvu de glandes. Par contre, le périgone caliciforme en est recouvert. On découvre encore des glandes en petit nombre sur les stipules, les parties végétatives de la plante n'en possèdent que très peu et fort dispersées. Mentionnons que l'on trouve des glandes jaunes discoïdes résineuses sans importance pratique sur la face inférieure des feuilles.

Les glandes sécrétrices sont cupuliformes et pluricellulaires. Elles sont isolées lors de la récolte en septembre-octobre. Les bractées sont détachées des cônes au-dessus d'une toile, puis secouées pour détacher les glandes que l'on passe à travers un tamis. Lavées, purifiées par décantation, séchées ensuite, les glandes sont conservées à l'abri de l'air et de la lumière. Elles constituent alors le lupulin ou farine de houblon, poudre très coulante, vert jaune à l'état frais, virant au jaune orange ou brun avec le temps. A l'état frais, le lupulin possède une odeur agréable, aromatique. Au cours du temps, cette odeur devient de plus en plus désagréable, et rappelle celle de l'acide valérianique.

Les cônes d'un bon houblon contiennent 8 à 12 % de lupulin. Alors que les cônes servent surtout en brasserie, le lupulin est réservé à l'usage pharmaceutique.

La qualité du lupulin est un critère aussi important que la quantité pour juger de la valeur d'un échantillon de houblon. Il est important de savoir qu'elle est largement influencée par le genre de culture, la nature du sol et les conditions climatiques et atmosphériques. Toutes les régions ne se prêtent pas à la culture du houblon ; en Europe, l'une des régions productrices parmi les plus importantes et les plus réputées est la Bavière, où les districts du Hallertau, « um Spalt », Feuchtwangen, Neustadt, Langenzen, Lauf, Altdorf peuvent être considérés comme les centres de culture par excellence du houblon.

A. Blank ²³ expose la technique de la culture du houblon en Suisse. Il donne des directives pour l'établissement d'une culture de houblon, décrivant le caractère d'un terrain propre à cette culture, les soins à donner avant et pendant la culture (engrais, traitements contre les parasites, etc.). Récolte, rendement et prix de revient (10 a. de culture de houblon nécessitent 145 heures de travail et environ fr. 250.— de matériel pour une année), installations de séchage sont passés en revue.

Deux méthodes permettent de juger de la qualité d'un houblon d'après Blank :

1. *l'analyse chimique*, indiquant la teneur en eau (10-15 %), en résines alpha (35 % au min.), bêta (46-48 %) et gamma (15 % au max.) ;
2. *l'examen physique* portant sur les points suivants :
 1. récolte et triage ;
 2. taux d'humidité ;
 3. couleur et brillant ;
 4. les cônes ;
 5. quantité et composition du lupulin ;
 6. arôme ;
 7. dégâts éventuels (parasites, traitements impropres, etc.).

2. Historique de l'emploi du houblon

On a longtemps cru que le houblon était ignoré des Anciens ; or, dans son *Histoire naturelle*, Pline l'Ancien énumère les plantes utilisées en Italie et mentionne le houblon dont les jeunes pousses, comme le panais des champs, servaient à donner du goût aux viandes. Pline ne parle pas d'un usage pharmaceutique à propos du houblon auquel il donne le nom de *lupus salictarius* ²⁴.

L'emploi du houblon en thérapeutique ou comme arôme de la bière n'était pas connu de l'antiquité. Bien que le houblon sauvage ait été répandu en Asie et en Europe, les Nordiques amarisaient leur bière avec d'autres plantes, telles qu'*Achillea millefolium* ou *Ledum palustre*. Il est difficile de savoir quel fut le premier peuple qui utilisa le houblon pour aromatiser la bière. On pense qu'il s'agit d'un peuple de l'Asie de l'Est ou du Caucase. On trouve cependant mention de la bière au houblon dans de vieilles chansons finnoises.

Dès le VIII^e siècle, le houblon semble avoir été cultivé en France et en Allemagne et utilisé dans la fabrication de la bière. L'Angleterre n'a connu la culture du houblon qu'à partir de la seconde moitié du XVI^e siècle. Il y a été introduit, non sans difficultés, par des émigrés protestants de la région de Poperinghe ²⁵ (Flandre occidentale). Les premiers qui incor-

porèrent du houblon à la bière furent considérés comme des faussaires. Pendant un certain temps, deux groupes rivalisèrent : les brasseurs de bière de houblon et les fabricants de bière traditionnelle à base de plantes.

La culture du houblon s'est introduite dans le nord de l'Europe au cours du moyen âge. En Suède, la culture du houblon est déjà très répandue au ^{xiv}^e siècle. Leonhart Fuchs, en 1543, dans son livre sur les simples indiquait à propos des lieux de croissance du houblon :

« ... le houblon cultivé est planté en Allemagne dans les endroits où la vigne ne vient pas, dans les jardins et les champs ; il sert à la préparation de la bière. Le houblon sauvage pousse en tous lieux, le long des clôtures, des haies épineuses, dans les fossés et au pied des murs auxquels il peut s'accrocher. »

D'abord concentrée en Bavière, la culture du houblon se répandit dans presque toute l'Allemagne, particulièrement dans le nord, tandis qu'elle diminuait en Bavière pour faire place à celle de la vigne.

Aujourd'hui, le houblon allemand n'est plus cultivé que dans le sud de l'Allemagne, en Bavière et dans certaines régions du Wurtemberg et du pays de Bade. D'après Zattler ²⁶, les plantations de houblon ne représentaient plus, en 1936, qu'un cinquième de la surface qu'elles occupaient il y a cinquante ans.

Les principales régions d'Allemagne pour la récolte du houblon sont en Bavière, Hallertau et Spalt, Hersbruck au Wurtemberg, Tettwang (en partie sur territoire badois), Rothenburg, Herrenberg, Weilderstadt.

Il existe également des houblons autrichiens d'origine styrienne, tchécoslovaques (Saaz, Randniz, Ausche), yougoslaves et alsaciens.

S'il n'est pas possible de déterminer avec certitude l'époque à laquelle les peuples occidentaux ont commencé à cultiver le houblon, on peut être néanmoins sûr que le renom dont cette plante jouit dans la médecine populaire est antérieur à son emploi pour aromatiser et conserver la bière.

Les renseignements que l'on trouve sur le houblon dans les différents ouvrages botaniques du moyen âge nous prouvent qu'il était utilisé jadis comme remède dans de nombreuses maladies.

Matthiolus ²⁷ vante son action sur l'intestin, dans la constipation, et ses qualités comme « dépuratif » et diurétique.

Lanicerus ²⁸ étend le champ des indications de la drogue qu'il préconise comme fébrifuge et expectorant.

D'après Tabernaemontanus ²⁹, le houblon était employé comme topique contre les éruptions cutanées.

Linné ³⁰ mentionne que les strobiles du houblon étaient utilisés comme tonique sédatif.

Tandis que la médecine de jadis utilisait également les feuilles et les rhizomes de houblon, il n'est plus question actuellement que de l'utilisation des cônes.

On utilise aujourd'hui encore les oreillers remplis de cônes de houblon pour favoriser le sommeil. Dans les pénitenciers on emploie le thé de houblon comme anaphrodisiaque.

Ce n'est vraiment qu'au début du XIX^e siècle que l'on recommanda l'emploi du houblon comme médicament (Deroche, 1803).

Le pharmacien parisien Blanche³¹ signala en 1822 l'emploi médicinal de lupulin.

La croyance populaire attribuait au houblon une action calmante et bienfaisante sur le corps et l'esprit. On le préconisait aussi comme diurétique et comme anaphrodisiaque. Il était considéré comme remède du bavardage, car on avait remarqué que les cueilleurs de houblon montraient une certaine somnolence qui « engourdissait » leur langue.

Les propriétés apaisantes, qui seraient dues à un principe volatil, faisaient utiliser le houblon à l'état frais, pour rembourrer les oreillers des insomniaques.

De nos jours, certaines de ces indications thérapeutiques se sont maintenues et l'on attribue aux principes actifs du houblon des effets sédatifs et antiseptiques.

3. Propriétés pharmacologiques

Les premiers essais pour isoler les principes actifs du houblon sont de Planche, C. A. Hofmann³² (1820), Payen et Chevalier³³ (1822), Pelletan³⁴ (1826). La première recherche détaillée est d'Ives³⁵ (1820). De nombreux auteurs se sont préoccupés de l'action sédatrice attribuée au houblon. Leurs opinions sont souvent divergentes, leurs observations parfois subjectives et par conséquent les résultats consignés dans la littérature ne doivent être acceptés qu'avec circonspection. Toutefois, le mérite revient à deux Polonais, Sikorski et Rusiecki³⁶, d'avoir mis au point une méthode objective pour l'appréciation sur l'animal des effets sédatifs du houblon ou de ses extraits. Etudiant l'action pharmacologique de différents produits d'extraction du lupulin sur des oiseaux et des souris, ces auteurs polonais attribuent à l'humulone et à la lupulone des propriétés hypnotiques et montrent qu'au cours du temps les principes actifs se résinifient rapidement et perdent leur activité.

Aune Staven-Grönberg³⁷ a étudié à l'Institut pharmacologique d'Helsingfors l'action des substances actives du houblon sur des grenouilles en prenant pour base les recherches antérieures de Jounzey³⁸, Frohmüller³⁹, Dreser⁴⁰, Farkas⁴¹ entre autres.

Il a utilisé pour ces expériences le lupulinate de sodium, l'essence de houblon ou humulène, des extraits et des dialysés de houblon ainsi qu'un mélange de dialysés de houblon et de valériane.

Les expériences de Staven-Grönberg ont permis de constater que :

Deux dixièmes de milligramme de lupulinate de sodium produisent chez la grenouille, après 20 minutes, un effet narcotique d'une durée de 8 heures environ.

Trois dixièmes de milligramme diminuent les réflexes de défense, sans paralyser toutefois les extrémités inférieures.

Quatre et cinq dixièmes de milligramme produisent une forte diminution de l'excitabilité motrice et sensorielle du système nerveux, puis une paralysie totale. La mort apparaît après 4 heures à 4 heures et demie.

D'après Staven-Grönberg les effets du lupulin, de l'acide lupulinique et de l'humulène sont analogues à ceux du lupulinate de sodium ; à noter que pour l'humulène l'intoxication débute par une phase d'agitation très marquée.

Des préparations de houblon de bonne qualité et fraîchement récolté, administrées sous forme d'extraits et de dialysés, produisent chez la grenouille, déjà à la dose de 4 millièmes de millilitre par gramme d'animal, un sommeil de 2 heures sans effets secondaires. Quatre heures après l'injection, les animaux se comportent de nouveau normalement.

La plus petite dose nuisible est de 0,01 cm³, son action toxique se traduit par une légère paralysie des extrémités. Par contre, la dose de 0,015 cm³ a provoqué la mort après 3 heures et 41 minutes.

Quant au mélange de dialysé de houblon et de dialysé de valériane, il produit déjà à la dose de 0,8 milligramme et après 20 minutes un sommeil d'une durée de 3 heures et demie. A la dose de 1 milligramme, le mélange provoque une profonde narcose après 12 minutes.

Il résulte de ces expériences que les principes actifs du houblon diminuent l'excitabilité motrice et sensorielle du système nerveux de l'animal d'expérience, chez lequel ils peuvent produire la narcose et éventuellement une paralysie des centres nerveux.

Ainsi les préparations actives de houblon peuvent être, selon Staven-Grönberg, assimilées par leur action aux narcotiques proprement dits.

Neumann ⁴² a employé le même mélange de dialysés que Staven-Grönberg au cours d'expériences faites sur des animaux plus évolués.

Il expérimenta tout d'abord sur des lapins en leur injectant dans les veines auriculaires de 1 à 16 cm³ du mélange de dialysé de houblon et de valériane, mais il se rendit compte, au cours de ses recherches, que le lapin se prêtait mal à des expériences avec des calmants en raison de sa force de résistance et de son tempérament naturellement flegmatique. Il employa dès lors des rats en leur injectant des doses rapportées au poids de l'animal de trois à dix fois supérieures à celles utilisées par Staven-Grönberg.

Neumann put alors démontrer que le mélange de dialysés houblon-valériane provoque un état semblable au sommeil normal pendant un certain temps sans aucun trouble secondaire simultané ou consécutif. Le comportement et l'attitude des animaux, surtout la position absolument naturelle dans laquelle ils s'endormaient, fournirent la preuve que le mélange utilisé remplissait, semble-t-il, les conditions exigées d'un narcotique.

Les essais rappelés ci-dessus ne sont pas les seuls que nous révèle la littérature. On trouve encore des essais faits sur des pigeons et des chiens par Seidel ⁴³ et sur des souris par Forst ⁴⁴.

Tous les auteurs reconnaissent au houblon une action sédatrice sur le système nerveux central. Plusieurs d'entre eux recommandent l'association lupulin-valériane comme très heureuse. Certains font observer que les principes actifs du houblon sont labiles et tendent à disparaître lors du vieillissement si l'on ne prend pas le soin de les stabiliser.

Déjà mentionné dans des textes fort anciens, le houblon n'en continue pas moins à faire l'objet de travaux modernes. Ce sont maintenant les propriétés antibiotiques de la lupulone et de l'humulone qui intéressent les chercheurs.

Nous citerons les travaux de Michener, Snell, Janse ⁴⁵ qui, après avoir décrit une méthode d'extraction de l'humulone et de la lupulone à partir du houblon, étudient les propriétés fongostatiques de ces substances dont Walker et Parker ⁴⁶, puis Lewis et collaborateurs ⁴⁷ avaient déjà démontré les propriétés bactériostatiques à l'égard de bactéries gram-positives.

L'activité antibiotique de la lupulone et de la lupulone sur le *Mycobacterium tuberculosis* est très nette in vitro. La faible toxicité de ces antibiotiques permet à Erdmann ⁴⁸ de faire des essais cliniques sur l'homme. Il administre à 10 patients une dose quotidienne de 5 g. de lupulone per os pendant 6 à 12 semaines. Il remarqua dans quelques cas une légère amélioration.

Quant à l'action sédatrice qui nous intéresse, nous remarquons qu'Erdmann note parmi quelques troubles éprouvés par ses malades une légère somnolence dont se plaignirent deux d'entre eux. Cette observation nous laisse douter de l'action sédatrice de la lupulone chez l'homme, puisqu'une dose répétée de 5 g., donc très forte, n'a permis d'observer qu'une légère tendance au sommeil dans deux cas sur dix.

Le pouvoir antibiotique du houblon semble dû à des principes différents de ceux responsables de l'action sédatrice.

A propos des observations faites par Sikorski et Rusiecki ⁴⁹, reconnaissant à la lupulone et l'humulone une action sédatrice sur des oiseaux et des souris, il paraît judicieux de se demander si les animaux utilisés réagissent comme l'homme ou si l'action sédatrice constatée n'était pas provoquée par d'autres corps que la lupulone et l'humulone.

Steidle ⁵⁰ a en outre remarqué au cours de ses recherches que les diverses espèces de houblon peuvent différer pharmacologiquement par leur teneur en principes actifs.

L'efficacité du houblon semble diminuer rapidement avec le stockage et varier fortement suivant l'année et le lieu de récolte.

Chez les animaux supérieurs on a observé quelquefois une tendance au sommeil, mais jamais, semble-t-il, même avec de fortes doses, narcose ou sommeil profond.

L'action toxique souvent notée est à rapprocher de celle de la lobéline ou de l'antipyrine.

Tout ce qui précède indique que le houblon ne peut être compté qu'avec réserve au nombre des substances possédant une action narcotique.

4. Rôle du houblon dans la préparation de la bière

Dans une étude relative aux propriétés sédatives du lupulin, il est difficile de passer sous silence le rôle que joue le houblon dans la préparation de la bière dont la consommation passe pour avoir une action hypnogène.

L'adjonction de houblon au moût de bière répond à plusieurs fins : grâce à sa teneur en huiles aromatiques, il donne à la bière un goût particulièrement agréable ; les substances amères qu'il renferme enlèvent à cette boisson son goût douceâtre ; les résines préviennent le développement du bacille lactique et empêchent ainsi l'acidification de la bière. Les tanins également contribuent à la conservation de la bière en la clarifiant par précipitation des substances albuminoïdes superflues. Nous verrons dans la suite de ce travail quels correctifs ont été apportés par des travaux récents au rôle des constituants du houblon dans la préparation de la bière.

Nous passerons également en revue les divers constituants connus du houblon.

À propos de la bière, il est important de noter qu'elle subit en brasserie une cuisson au cours de laquelle l'acide alpha ou humulone est transformé en un mélange de deux substances appelées « résines molles alpha, produits de cuisson », pour les distinguer des « résines molles alpha, produits d'oxydation » issus de l'action de l'oxygène de l'air sur le houblon pendant le stockage.

Le constituant essentiel du produit de cuisson est un isomère de l'acide alpha : l'acide iso-alpha ou isohumulone⁵¹ dont la solubilité au pH de la bière est beaucoup plus élevée que celle de l'humulone. Il en résulte que l'isohumulone est le principal vecteur de l'amertume de la bière.

Par le fait que, dans la règle, les brasseurs emploient du houblon frais ou en bon état de conservation, c'est-à-dire pratiquement pauvre en produit d'oxydation, l'amertume de la bière à doses égales de houblon dépend essentiellement de la transformation de l'humulone en isohumulone. Cette transformation est d'autant plus marquée que le houblon est cuit plus longtemps avec le moût.

On sait qu'après deux heures de cuisson, la transformation n'est pas encore terminée, mais une prolongation du temps de cuisson n'est pas recommandable, car la bière prendrait une amertume désagréable.

Dans la partie expérimentale de cette étude, nous décrivons une méthode de préparation de « décoctions » de lupulin dont la rapidité exclut vraisemblablement, si l'on se réfère à l'observation précédente, la transformation de l'humulone en isohumulone.

Quant à l'huile essentielle de lupulin, sachant qu'elle est facilement entraînée par la vapeur d'eau, on peut dire qu'après deux heures de cuisson elle est pratiquement éliminée. Cependant, lorsque la durée de cuisson est réduite, il reste en solution de l'huile essentielle qui donne d'ailleurs à la bière un arôme de houblon nettement perceptible. La quantité de houblon à employer en brasserie dépend essentiellement du type de bière, des exi-

gences des consommateurs, de l'alcalinité de l'eau de brasserie et de la valeur du houblon en substances amères.

Pour la bière blonde de garde (Lagerbier) on prend environ 130 à 250 g. de houblon par hectolitre de moût ; pour la bière de Dortmund 180 à 220 g. par hectolitre ; pour la Pilsner 250 à 450 g. par hectolitre ; pour la Munich 130 à 170 g. par hectolitre ⁵².

Naturellement, la teneur en substances amères du houblon varie d'année en année et de houblon en houblon. Pour utiliser des doses qualitativement égales, il faut la déterminer, car l'amertume de la bière doit toujours être la même pour plaire aux consommateurs.

Il faut garder présent à l'esprit que les méthodes d'adjonction du houblon varient suivant les brasseurs. Souvent, au lieu d'ajouter le houblon en une fois, on en ajoute une partie au moût avant la cuisson, puis une autre en début de cuisson, et le reste un quart d'heure avant la fin de la cuisson. Il est clair que de cette façon la dernière adjonction est pauvre en produits de cuisson, mais relativement riche en huiles essentielles. C'est aussi la raison pour laquelle on réserve en général pour cette dernière dose les houblons à l'arôme le plus fin.

En résumé, il est important de noter à propos de la bière et pour notre étude que :

1. les substances amères du houblon lui donnent son amertume, elles augmentent son pouvoir moussant et elles assurent sa conservation ;
2. les substances amères sont différentes de l'acide alpha ou humulone qui se dissout relativement facilement dans les moûts, mais est difficilement soluble au pH de la bière ;
3. elles se distinguent également de l'acide bêta ou lupulone dont la solubilité dans les moûts ou la bière est si faible qu'il ne possède pratiquement pas de valeur pour la brasserie ;
4. l'huile essentielle de houblon confère à la bière son arôme caractéristique que l'on remarque surtout avec des bières blondes fortement houblonnées et dans certaines bières spéciales ;
5. si le houblon n'est pas cuit trop longtemps, il reste dans la bière de faibles quantités d'huile essentielle.

5. Principes actifs

L'emploi pharmaceutique du houblon et du lupulin a été consacré par leur admission comme drogues officinales dans les pharmacopées des pays suivants :

Brésil (lupulin),
France (houblon),
Mexique (houblon),
Suisse (lupulin),

où ils figurent encore dans les dernières éditions. Par contre, *The British Pharmaceutical Codex* 1949 n'a pas retenu le lupulin qui figurait dans l'édition de 1934.

La *Pharmacopée helvétique*, Editio Quinta, définit ainsi le lupulin :

« Les poils glanduleux de l'inflorescence femelle fructifère de *Humulus Lupulus* L. (Moraceae-Cannaboideae).

» Le lupulin est constitué par une poudre rouge jaunâtre ; examiné au microscope, il montre presque uniquement des poils ovoïdes-coniques atteignant jusqu'à 260 μ de longueur, constitués par une assise cupuli-forme de cellules sécrétrices étroites, de laquelle la cuticule s'est détachée. La cuticule porte les empreintes des cellules sécrétrices. La cavité située entre la cuticule et les cellules sécrétrices est remplie d'une résine jaunâtre soluble dans l'alcool.

» Le lupulin a une saveur amère et une odeur particulière, fortement aromatique. L'odeur d'acide valérianique ne doit pas être prononcée.

» Cendres : 12 % au maximum.

» Conservation : à l'abri de la lumière, en récipient bien fermé. »

La *Pharmacopée helvétique*, ainsi que les autres pharmacopées, ne se préoccupent pas de la teneur en principes actifs ou en huile essentielle du lupulin. Le Commentaire ⁵³ de la *Pharmacopée helvétique* mentionne que seule une méthode biologique peut permettre de déterminer l'activité du lupulin.

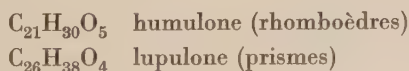
Cependant, les principes actifs du lupulin ont fait l'objet de recherches assez nombreuses, tant pour améliorer l'utilisation du lupulin en brasserie que pour tenter d'élucider à quoi étaient dues son action sédative et son action antibiotique.

Les principes actifs du lupulin, à propos desquels les recherches les plus importantes furent faites, sont communément désignés comme « substances amères » en raison même de leur saveur très amère.

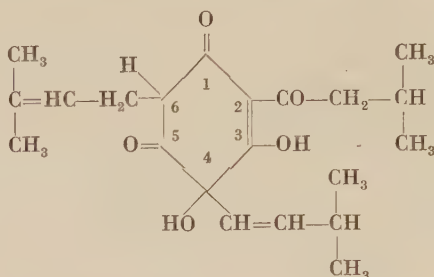
On en connaît cinq :

l'acide amer alpha ou humulone ;
l'acide amer bêta ou lupulone ;
la résine molle alpha ;
la résine molle bêta ;
la résine dure gamma.

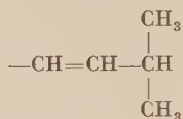
La structure chimique de l'humulone et de la lupulone a pu être élucidée. On les a isolées à l'état cristallisé. Elles répondent aux formules globales suivantes :



dont la structure a été établie grâce aux recherches de H. Wieland ⁵⁴ et W. Wöllmer ⁵⁵ ; on attribue à l'humulone la formule développée suivante :

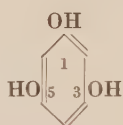


La formule développée de la lupulone diffère de celle de l'humulone par un reste amylène

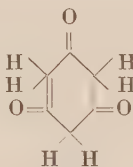


substitué en C₄ au groupe hydroxyle.

Ces formules développées montrent que l'humulone et la lupulone sont des combinaisons quinoliques de la phloroglucine ou trioxybenzène symétrique,



qui réagit très souvent sous la forme tautomère correspondant à la formule tricétohexaméthylène



On donne le nom de *quinols* aux composés possédant une liaison double en dehors du noyau et en particulier à ceux qui contiennent des groupes hydroxyles en position para ou ortho, par rapport au groupe carbonyle, dont les formules développées de l'humulone et de la lupulone rappellent la structure.

Humulone et lupulone possèdent une réaction acide par émolisation et donnent, par conséquent, une coloration rouge avec le chlorure ferrique.

Elles se décomposent très facilement en donnant naissance aux résines molles alpha et bêta, termes surtout utilisés en brasserie, et à la résine dure gamma qui ne possède pas d'amertume. Il semble que simultanément se forme de l'acide valérianique.

Grâce à leur solubilité dans l'hexane, l'humulone et la lupulone peuvent être séparées des trois autres substances amères dont la structure mal connue paraît très complexe.

Les cinq substances amères sont solubles dans l'éther et leur ensemble constitue la résine totale du lupulin.

Comme nous le mentionnons ci-dessus, il semble que les résines alpha, bêta et gamma soient des produits de transformation par polymérisation et oxydation de divers dérivés, spécialement de l'humulone et de la lupulone, qui se transforment respectivement en résine alpha et résine bêta, le terme ultime de cette décomposition étant la résine dure gamma que l'on a d'ailleurs identifiée comme un mélange de résines molles alpha et bêta.

On trouve dans la littérature de nombreuses analyses de houblon. Nous empruntons à une encyclopédie technique ⁵⁶ l'analyse suivante :

Humidité	6 -12	%
Cendres	7 -10	%
Résine	11 -21	%
Huile essentielle	0,2- 0,5	%
Pectine	12 -14	%
Tanin	2 - 4	%
Matières azotées, en protéine . . .	13 -24	%
Glucose et fructose	3 - 4	%

Zattler ⁵⁷ donne les pourcentages suivants comme composition générale moyenne du houblon :

Eau	12,5	%
Cendres	7,5	%
Oxyde de K	20 -44	%
Oxyde de Ca	13 -24	%
Oxyde de Mg	4 - 7	%
Oxyde pentaphosphorique	10 -21	%
Oxyde silicique	11 -21	%
SO ₃	3 - 5,5	%
Fibres brutes	13,3	%
Protéines	17,5	%
Huiles essentielles	0,4	%
Extrait éthéré	18,3	%
Tanins	3	%
Substances extractives non azotées	27,5	%

La composition chimique du houblon est indiquée comme suit dans Ullmann ⁵⁸ :

Eau 0 % pour du houblon anhydre
11 % pour du houblon séché à l'air

	<i>Houblon anhydre</i>	<i>Houblon séché à l'air</i>
Substances amères	18,3 %	16,3 %
Huile essentielle	0,5 %	0,4 %
Tanin	3,5 %	3,1 %
Protéine (HN × 6,25)	20 %	17,8 %
Cendres	8,5 %	7,6 %
Fibres	15,0 %	13,4 %
Azote libre des substances extraites	34 %	30,2 %

D'après la même encyclopédie voici la composition de la résine totale dans un houblon allemand :

	<i>Anhydre</i>	<i>Séché à l'air (eau = 11 %)</i>
Acide amer alpha	6,6 %	5,9 %
Acide amer bêta et résines molles	9,5 %	8,4 %
Résines dures	2,2 %	2 %
Résine totale	18,3 %	16,3 %
Résine dure en % de résine totale	12 %	12 %
Substances amères selon Wöllmer	7,7 %	6,8 %

Parmi les composés précédents dont la plupart sont communs à bien d'autres végétaux, il existe trois groupes de substances qui déterminent la valeur du lupulin pour la brasserie :

l'huile essentielle ;
les substances tannantes ;
les substances amères.

a) *L'huile essentielle*

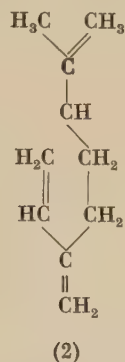
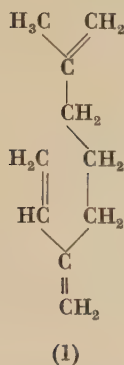
L'huile essentielle du houblon se compose d'après Stockx ⁵⁹ d'un mélange d'essences, dont les proportions varient selon la provenance du houblon. C'est à ces essences qu'est dû l'arome caractéristique du houblon.

D'après Lerner ⁶⁰, il faut admettre que le lupulin peut contenir jusqu'à 3 % d'huile essentielle. Selon A. Guillaume et E. Lang ⁶¹, les cônes de houblon donnent 1 % d'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau.

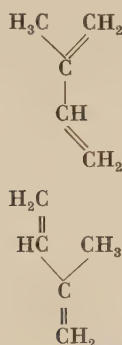
A. C. Chapman ⁶² a réussi à séparer l'huile essentielle de lupulin, obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, en quatre fractions.

La première fraction optiquement active, se transforme rapidement en une résine incolore et semble être un mélange de deux hydrocarbures non saturés. Chapman croit que l'un d'eux est un terpène oléfinique C₁₀H₁₆ identifiable au myrcène déjà étudié par Semmler.

D'après Semmler ⁶³, le myrcène se présenterait sous deux formes :
 une forme linoléénique (1) ;
 une forme terpinoléénique (2).

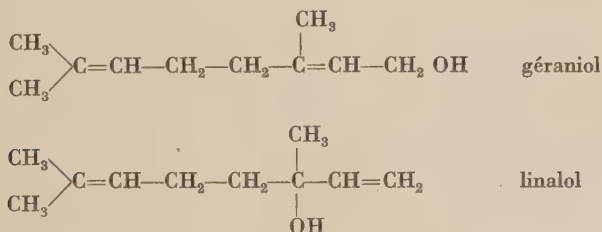


Ces deux formes proviendraient de la polymérisation de l'isoprène C_5H_8



Semmler appelle « humulène » le second hydrocarbure présent dans la première fraction obtenue par Chapman.

La deuxième fraction est probablement un mélange de géraniol $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$ et de son isomère structural, le linalol.



La troisième fraction comprend un ester donnant par saponification de l'acide isononylique $C_9H_{18}O_2$. On a en outre pu y mettre en évidence du géraniol, du linalol et de l'humulène.

La quatrième fraction se compose du sesquiterpène humulène qui, étant oxydé, se transforme en acide diméthylsuccinique asymétrique.

D'après Wasicky ⁶⁴ l'huile essentielle de lupulin contient :

30-50 % de myrcène ;
15-20 % d'humulène ;
plus de 20 % d'ester ou myrcénol

et en outre du dipentène, du géraniol, les acides formique, heptylique, valérianique, acétique, décylque, nonylique, octylique, butylique, isononylique. Le valérol que contient l'essence de houblon se transforme en acide valérianique par vieillissement. Le lupulin prend alors une odeur de fromage fort désagréable.

D'autres auteurs prétendent que l'huile essentielle contient un ester de l'acide nonylique et vraisemblablement un ester géranylique. Par oxydation à l'acide chromique se forme de l'acide acétique et des dérivés de l'acide succinique et de l'acide diméthylsuccinique.

Outre le myrcène, l'huile essentielle contient une grande proportion d'un sesquiterpène bouillant à 263-266° C (l'humulène de Chapman) qui se compose principalement d' α -cariophyllène mélangé avec de petites quantités de β -cariophyllène.

La composition de l'huile essentielle se modifie avec l'âge, de sorte que l'essence se trouvant dans les glandes de lupulin se transforme graduellement.

Plus vieilles sont les glandes à lupulin, plus elles sont riches en acide valérianique.

Il est important de souligner que l'essence pure de houblon garde encore après des années une agréable odeur fruitée comme quelques esters amyliques (Flückiger).

L'huile essentielle de houblon est jaune clair à brun rouge, elle n'est pas amère et possède une odeur caractéristique. Elle se dissout difficilement dans l'alcool, surtout quand elle n'est pas fraîche.

Sa densité à 15° varie entre 0,823 et 0,899.

$\alpha_D = -20^\circ$ à $+2^\circ 27'$.

En résumé, il est important de souligner que :

1. L'huile essentielle contient surtout des substances hydrocarbonées du groupe des terpènes, comme le myrcène et l'humulène.
2. Par stockage du houblon, l'huile essentielle se résinifie partiellement en résine dure.

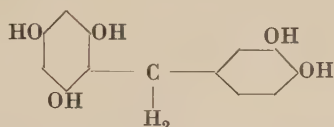
3. La teneur de la résine totale en résine dure est un critère du degré d'oxydation des substances amères ou du vieillissement du houblon. Ce critère est beaucoup plus sûr pour l'appréciation de l'âge d'un houblon que la couleur du lupulin qui peut déjà brunir lors d'un séchage à température trop élevée. Un houblon frais ou bien conservé ne contient pas plus de 15 % de résine dure dans la résine totale.

b) *Les tanins*

Stockx⁶⁵ rapporte que le premier chercheur qui se soit occupé de l'étude de ces tanins fut Etti. Ce dernier obtint le tanin à l'état pulvérulent, soluble dans l'eau et dans l'alcool dilué, mais insoluble dans l'alcool anhydre et dans l'éther.

En étudiant les produits de décomposition du tanin de houblon lors de la fusion en présence de KOH, Etti arriva à la conclusion que le tanin du houblon doit être un ester de l'acide protocatéchique avec un glucoside phloroglucinique.

Freudenber⁶⁶ démontra toutefois qu'il ne s'agit pas en l'occurrence d'un ester mais d'un produit de condensation (penta-oxybenzophénone).



Hayduck⁶⁷ a élaboré une méthode pour obtenir le tanin du houblon à l'état pur par précipitation fractionnée en solution alcoolique par le sous-acétate de plomb.

Le phlobaphène précipite en premier sous forme d'un dépôt brun rouge, le tanin vient ensuite formant un dépôt jaune. Les composés du plomb peuvent ensuite être dédoublés par H₂S.

L'action du phlobaphène et du tanin sur les protéines est différente : le phlobaphène précipite directement et quantitativement les protéines dans leurs solutions ;

le composé tanin-protéine se dissout au chauffage et ne précipite qu'à froid.

On a longtemps supposé que le tanin précipitait certaines protéines dans le moût de bière. Il a cependant été trouvé que ces protéines étaient déjà coagulées par le seul chauffage avant l'addition de houblon, et, en vérité, Chapman n'attribue aucune valeur en brasserie au tanin du houblon.

Le tanin du houblon s'obtient aussi par précipitation par l'acétate basique de plomb, à partir d'un extrait aqueux. C'est une substance amorphe soluble dans l'eau, l'acétone et l'alcool méthylique, insoluble dans le benzène. Les produits de dédoublement sont le glucose, la phloroglucine et l'acide protocatéchique.

Selon certains auteurs, les glandes à lupulin ne contiennent pas de tanin. On en trouve 3 à 6 % dans le houblon. On prétend qu'il est utile,

lors de la préparation de la bière, car il l'éclaircirait et la conserverait par précipitation des substances albuminoïdes superflues.

c) Substances amères

Les substances amères du houblon peuvent être extraites par l'éther, l'alcool éthylique ou l'alcool nonylique.

Les deux plus importantes sont l'humulone (P.F. 56°) et la lupulone (P.F. 90,5°/92°).

Dans *Archives of Biochemistry* (vol. 19, 1948, p. 199), on lit que le houblon contient ordinairement 5 à 10 % d'humulone et 0,8 % de lupulone.

Humulone et lupulone sont solubles dans l'hexane, mais tandis que l'humulone est précipitable par l'acétate de plomb, la lupulone ne l'est pas. Ces deux substances amères sont des monoacides faibles, titrables par des alcalis. Toutes deux donnent avec le chlorure ferrique une coloration rouge qui dénote un groupe énoïque.

<i>Humulone</i>	$C_{21}H_{30}O_5$	poids moléculaire 362,45, P.F. 64-65° ;
	synonymes :	acide humulone alpha lupulinique, acide amer alpha.

Propriétés physico-chimiques

$\alpha_D^{20} = -232^\circ$ (0,5 g. dans 7,3 g. benzène).

Facilement soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, la benzine, l'alcool, le benzène, etc., l'humulone peut être précipitée par l'acétate de plomb en humulate de plomb sous forme d'aiguilles jaunes vertes.

L'humulone est peu soluble dans l'eau bouillante et s'y dissout surtout sous forme colloïdale ; au refroidissement, une partie se dépose à nouveau.

La solution aqueuse d'humulone est plus acide que celle de lupulone. A l'encontre de la lupulone, l'humulone forme avec les métaux lourds des sels.

L'humulone est thermolabile.

Sous l'influence de l'oxygène, elle se résinifie en résine molle alpha qui, à son tour, peut se transformer en résine gamma.

L'humulone est cependant plus stable à l'air que la lupulone. L'humulone est fortement amère, nettement plus que la lupulone, et prédomine dans les houblons très amers.

En solution alcoolique de soude caustique se forme l'acide humulinique

$C_{15}H_{24}O_4$ (aiguilles amères, incolores, P.F. 92°5).

En solution alcoolique de potasse caustique se forme à côté de la résine de l'acide valériannique.

<i>Lupulone</i>	$C_{26}H_{38}O_4$	poids moléculaire 414,56, P.F. 92-94° ;
	synonymes :	acide lupulone bêta lupulinique, acide amer bêta.

Propriétés physico-chimiques

Prismes fragiles se résinifiant à l'air avec une odeur d'acide gras, optiquement inactive à la différence de l'humulone.

Réduit la solution d'argent ammoniacale.

Sous l'effet de l'oxydation au permanganate, produit de l'acide valériannique.

Soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole, l'hexane, l'isooctane.

Légèrement soluble dans les solutions aqueuses neutres ou acides, alors que l'humulone n'est que légèrement soluble dans l'eau bouillante.

Tout comme l'humulone forme un sel de sodium très soluble dans l'eau.

L'étude toxicologique et pharmacologique de la lupulone⁶⁸ sur les animaux de laboratoire (souris, rat, cobaye, lapin, chat, singe) montre qu'elle n'est pas irritante pour les muqueuses (solution huileuse).

La DL₅₀ est de 600 mg/kg. chez la souris, voie i.m., déterminée avec une solution huileuse à 1,5 %, et de 330 mg/kg. chez le rat.

Per os, en utilisant une suspension de lupulone à 5 % dans une solution aqueuse à 6 % de gomme arabique, on a respectivement trouvé 1500, 1800 et 130 mg/kg. pour la souris, le rat et le cobaye. Les signes de l'intoxication sont la congestion et l'hémorragie pulmonaires, hépatiques, rénales.

Des essais d'intoxication chronique ont duré deux semaines pendant lesquelles on procéda à l'administration intragastrique de doses quotidiennes de 450, 300 et 150 mg/kg. pour le rat qui provoquèrent une diminution de la croissance pendant la deuxième semaine d'ingestion. Pour les lapins, les cobayes et les singes, les doses furent respectivement de 300, 30 et 200 mg/kg. En sacrifiant une partie des animaux, les expérimentateurs remarquèrent une infiltration mononucléoleucocytaire, principalement autour des bronches. Ce genre de lésion se retrouve chez la souris ayant reçu 2 ou 4 % de lupulone dans la nourriture pendant quarante jours.

Par voie intraveineuse, la lupulone stimule la respiration comme le fait le cardiazol.

Il est important de noter qu'au cours de ces essais de toxicité et de tolérance, aucune action sédatrice ou hypnotique n'a été mentionnée par les auteurs.

Humulone et lupulone possèdent des propriétés antiseptiques : elles inhibent, entre autres, les fermentations lactique et butyrique et sont bactéricides, entre autres, à l'égard des *Sarcina*. Leur influence sur le développement des bactéries acétiques est faible (Stockx).

d) Alcaloïde

Griessmayer⁶⁹ a extrait du houblon une faible quantité d'un liquide à odeur de coniine. Il supposa que c'était un alcaloïde volatil, sans toutefois avoir pu étayer cette hypothèse par des arguments sérieux. Or, lors d'une recherche postérieure effectuée par Power, Tutin et Rogerson⁷⁰, cette hypothèse fut confirmée, de sorte qu'on peut admettre la présence

dans le houblon d'un alcaloïde volatil, bien qu'il s'y trouve en quantité si faible qu'il n'a pas encore pu être identifié.

Nous l'avons d'ailleurs mis qualitativement en évidence par chromatographie sur papier.

e) *Recherche des principes actifs*

Parmi les nombreuses méthodes pour l'extraction de la lupulone et de l'humulone données par la littérature, beaucoup sont difficiles à reproduire, parce que décrites avec trop peu de détails, à tel point que Beyaert et Cornand ⁷¹ pouvaient écrire : « Il n'existe actuellement aucune méthode à rendement suffisant permettant d'extraire du houblon ou du lupulin les deux acides α et β ou l'un d'eux à l'état pur cristallisé. »

Dans ces conditions, il nous a paru utile de citer dans ce travail une méthode reproductible permettant de préparer à partir du lupulin l'humulone et la lupulone.

Il s'agit de la remarquable étude de Beyaert et Cornand ⁷², qui furent les premiers à recourir à l'adsorption chromatographique pour éliminer les impuretés gênantes. Nous en reproduisons ci-dessous le résumé :

L'extrait de houblon ou de lupulin obtenu à partir de l'alcool méthylique est traité à l'éther de pétrole après adjonction de la quantité appropriée d'eau.

Le résidu de cet extrait est chromatographié en solution benzénique sur un gel de silice actif (silicagel). Celui-ci laisse passer les acides α et β ainsi qu'une petite quantité d'impuretés légèrement colorées.

Après évaporation et reprise du résidu dans l'alcool méthylique, l'acide α est précipité sous forme d'humulate de plomb qui fournit, par décomposition à l'acide sulfurique, un produit déjà relativement bien cristallisé.

En passant par le complexe avec l'orthophénylène diamine, il est possible d'obtenir un acide α très pur.

Du filtrat alcoolique de l'humulate de plomb on élimine le plomb par l'acide sulfurique, puis on extrait par l'éther de pétrole.

Après évaporation de cet extrait, la quasi-totalité de l'acide β , y contenue cristallise. Ce produit est facilement cristallisable dans l'éther de pétrole à basse température.

Pour les détails de la méthode nous renvoyons à la publication originale.

Govaert et Verzele ⁷³ ont démontré que les résines molles qui se forment dans le houblon aux dépens des acides α et β ne communiquent pas d'amertume à la bière. Elles ne peuvent intervenir par conséquent dans la détermination de la valeur brassicole d'un houblon.

D'après les mêmes auteurs, leur dosage sous forme de résines molles totales ou de la fraction β est donc sans aucun intérêt. C'est pourtant encore au dosage des résines molles totales et de l'humulone que procèdent actuellement la plupart des brasseurs.

La discussion des avantages ou inconvénients pour la brasserie des diverses méthodes analytiques connues sort du cadre de notre travail.

Nous ne voudrions retenir des très intéressantes recherches de Govaert et Verzele que :

les substances que l'on a l'habitude d'appeler les résines molles α et β sont en réalité des mélanges complexes de plusieurs corps dont certains peuvent provenir de la transformation dans le houblon des acides correspondants par oxydation ou polymérisation. Il n'est pas douteux, selon ces auteurs, que ces produits sont infiniment moins solubles que les acides dont ils dérivent, et qu'ils ne présentent plus qu'un intérêt négligeable. Ils ont en effet pu démontrer par des essais de brassage que la fraction des résines molles totales, privée quantitativement par chromatographie des acides α et β , c'est-à-dire de l'humulone et de la lupulone, ne communique aucune amertume à la bière, même si l'on en ajoute des quantités correspondant à 900 g. de houblon à l'hectolitre, soit près de quatre fois plus que normalement !

Par contre Govaert et Verzele ont remarqué qu'une autre substance à laquelle on donne également le nom de résine molle et qui se forme aussi aux dépens de l'humulone, *mais seulement au cours du brassage*, se trouve être de la plus haute importance pour la fabrication de la bière, car c'est sous cette forme, bien plus soluble et beaucoup plus amère, que l'humulone entre en solution dans le moût de bière et se laisse extraire de la bière : ce corps est un isomère de l'humulone auquel ils ont donné le nom d'isohumulone.

Les mêmes auteurs, recherchant les conditions de transformation de l'humulone, ont observé que dans l'alcool méthylique l'isomérisation de l'humulone se produit avec un rendement de 100 % sans hydrolyse secondaire.

L'isohumulone obtenue de cette façon se présente sous forme d'une huile épaisse, jaune orange, d'un goût excessivement amer (beaucoup plus amer que l'humulone) distillant à 150° sous une pression de 0,005 mm. On obtient cette substance facilement à l'état solide en la refroidissant à —78° par la neige carbonique. Broyée, elle se présente alors sous forme d'une poudre presque blanche fondant de —10° à —5°.

Dosage de l'huile essentielle du houblon

A. Guillaume et E. Lang ⁷⁴ ont recouru comme nous à la préparation d'une eau distillée de cônes de houblon par distillation à la vapeur d'eau pour entraîner l'essence de la prise d'essai et jusqu'à distillation inodore.

L'essence est séparée de l'eau par extraction à l'éther. L'éther est éliminé par ébullition sous pression réduite. Après évaporation de l'éther résiduel à l'air libre puis au dessiccateur, le résidu est pesé et fournit la teneur en huile essentielle.

Ces auteurs déduisent des résultats obtenus au cours de leurs expériences que les variations de teneur en essence suivent celles des teneurs en principes amers.

6. Conclusion

Il ressort de cette étude bibliographique qu'un petit nombre seulement des principes actifs du lupulin est chimiquement bien défini. Les travaux récents se rapportent soit à l'industrie de la bière soit à la mise en évidence des propriétés antibiotiques de la lupulone et de l'humulone.

Certains auteurs publient régulièrement des mises au point sur la structure chimique des produits de dégradation de l'humulone et de la lupulone. Depuis environ vingt années aucun travail de recherche systématique n'a, à notre connaissance, été consacré à la mise en évidence des propriétés sédatives du lupulin.

C'est pourquoi les données historiques, chimiques et pharmacologiques que nous avons résumées dans les pages précédentes légitiment l'étude entreprise dans la partie expérimentale de ce travail en vue de contribuer à mieux faire connaître les principes propres au lupulin et dont l'activité se révèle sédative sur le cyprin doré.

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE L'ACTION DU LUPULIN SUR LE CYPRIN DORÉ

1. Introduction

Cette étude utilise un test mis au point par Fauconnet ⁷⁵, auquel, pour faciliter la lecture et la compréhension de nos essais, nous empruntons le tableau suivant :

*Tests et signes conventionnels utilisés pour l'étude pharmacologique de la racine
de Valériane sur le Cyprin doré*

1. Rythme respiratoire (nombre des mouvements des opercules par minute; spasmes S ou SS)		
2. Activité spontanée	{	nulle 0 très faible = diminuée —
3. Réaction à une excitation de la vue		normale N
4. Réaction à une excitation de l'ouïe		augmentée +
5. Réaction à une excitation du toucher	{	exagérée ++ spasmodique S ou SS
6. Equilibre	{	ne vacille pas en nageant 0 vacille à peine — vacille peu + vacille fortement ++ est immobile sur le flanc /
7. Stabilité : se laisse-t-il retourner sur le dos ?	{	non 0 difficilement — facilement + ou ++
8. Stupeur : est-il entraîné par un courant d'eau ?	{	non 0 à peine — partiellement + entièrement ++ se débat vivement 0 se débat faiblement —
9. Narcose au sortir de l'eau	{	ne fait que quelques mouvements + est immobile ++

Les tests 1 à 5 concernent des fonctions simples, les tests 6 à 9 des fonctions générales ; les premiers peuvent fournir des renseignements sur l'atteinte de certains organes, les autres sur la coordination des fonctions. Par spasmes nous entendons soit des contractions vives ou prolongées (cloniques ou toniques ¹), soit des réactions de défense plus ou moins incoordonnées. Il est parfois difficile de distinguer les unes des autres, elles sont l'indice du début de l'intoxication.

2. Remarques préliminaires

Au début de nos expériences, nous avons suivi tous les tests de Fauconnet, puis, remarquant que les tests 3 et 4 étaient toujours semblables dans leurs résultats au test 5, nous les avons supprimés ; c'est pourquoi ils ne figurent pas sur tous nos tableaux.

Fauconnet expérimentait avec cinq poissons à la fois, mais, au cours d'essais préliminaires, voyant la très grande toxicité de la plupart de nos préparations (souvent nous obtenions cinq morts en quelques minutes), nous avons fait chaque essai avec seulement quatre poissons simultanément.

La fréquence des manifestations toxiques observées au cours des essais préliminaires sur le cyprin doré nous fit penser :

Soit à l'existence de principes ichthyotoxiques dans le lupulin, soit au fait que l'espèce animale considérée ne convenait pas pour un test pharmacologique d'action sédative.

Bouchardy ⁷⁶ a éliminé la première hypothèse en montrant que le tétard était au moins aussi sensible que le cyprin aux principes actifs du lupulin : il ne s'agit donc pas de principes ichthyotoxiques.

Quant à la deuxième hypothèse, il ne nous paraissait pas judicieux de la retenir avant d'avoir contrôlé attentivement la valeur des différents tests, utilisés pour l'étude pharmacologique d'une drogue, sur le cyprin doré, en fonction de l'observation détaillée de son comportement normal.

C'est la raison pour laquelle, avant d'étudier l'action de diverses extractions de lupulin, nous avons observé le comportement normal du cyprin doré.

3. Etude du comportement normal du cyprin doré

a) *Les poissons et leur entretien*

Nous avons étudié l'action pharmacologique du lupulin sur le *Carassius Auratus* — il s'agit du poisson rouge ordinaire ou cyprin doré. Les poissons

¹ cloniques : rapides contractions musculaires produisant de grands mouvements.

toniques : contractions relativement durables, déterminant une rigidité presque permanente, interrompue parfois par des secousses.

utilisés pour ces essais provenaient tous de la pisciculture de Bologne (Italie).

7 Selon les indications de Fauconnet ⁷⁷, nous avons choisi les cyprins d'une longueur de 5 à 7 cm. et d'un poids de 4 à 6 g. Pour exclure l'influence d'un mélange de races, nous avons sélectionné les poissons de couleur rouge uniforme. Nous avons rejeté ceux qui présentaient des nageoires en « voile ». Nous avons toutefois pu constater que même des poissons légèrement bâtardés ne présentaient pas de différences notables de comportement avec ceux que nous avons considérés comme race pure. Dans l'intervalle des essais, les poissons étaient conservés dans un aquarium de 25 l., où chacun d'eux disposait d'un volume vital minimum d'un litre. L'aquarium était nettoyé chaque semaine et l'eau changée une à deux fois par semaine, suivant le nombre de poissons. L'approvisionnement de l'eau en oxygène étant un point très important, nous avons installé une pompe vibratoire pour aquarium qui nous garantissait la saturation en air de l'eau de l'aquarium.

Les cyprins dorés sont friands d'élodées (*Elodea Canadensis*), genre de plantes aquatiques d'eau douce, originaires du Canada, de la famille des Hydrocharitacées. Leur aquarium en fut largement pourvu et nous constatâmes que les poissons en mangeaient des quantités appréciables. La nourriture des animaux consistait en outre en œufs desséchés de *Daphnies* (Crustacés phyllopoètes tout à fait primitifs — poux aquatiques, puces d'eau). Parmi les poissons soignés de la manière précitée, nous n'avons pas constaté de mort spontanée. Toutefois, pendant une absence on enregistra la mort de plusieurs animaux. Ces pertes furent provoquées par la suralimentation, comme nous avons pu le vérifier au cours d'essais que nous entreprîmes et grâce aux renseignements des pisciculteurs :

Les œufs desséchés de *Daphnies* constituent un aliment particulièrement concentré. Lorsque les poissons en consomment trop, ils gonflent et meurent d'éclatement de leur appareil digestif.

Au cours de nos expériences, la température de l'aquarium fut maintenue à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

b) Observations sur le comportement normal des cyprins dorés

Lors de nos observations, les tests 2 à 8 ne donnent pas lieu, dans la limite des résultats biologiques, à des écarts notables. Nous avons donc enregistré les réactions normales. Pour le test 1, nous avons constaté par contre des divergences assez caractérisées pour nous attarder à leur étude :

Le rythme respiratoire donne en effet des renseignements assez précieux sur le métabolisme d'un animal, partant sur son état de santé au moment de l'observation.

Nous avons procédé aux essais suivants : Pour chaque série d'observations nous avons mis quatre poissons, sélectionnés selon les indications données précédemment, dans quatre fois 250 ml. d'eau du robinet à 20°C versée dans des béciers de 600 ml. (forme haute, diamètre 8 cm.).

Nous avons observé le rythme respiratoire en comptant 20 à 30 mouvements des opercules. Nous en avons déduit le nombre de mouvements correspondants par minute. Les valeurs étaient notées après 5, 10, 20 et 30 minutes.

Comportement normal du *Carassius Auratus*
Etude de la respiration (mouvements des opercules/minute)
Température 20° C dans l'eau ordinaire

$$\text{Ecart absolu } \% = \frac{\Delta \text{ max. } 8.100}{\Sigma}$$

TABLEAU 1

	5'		10'		20'		30'		Σ	Moyenne arithm.	Δ max.	Ecart absolu %
Poisson	A	B	A	B	A	B	A	B	A+B	Σ 8		
I	92	110	80	100	70	90	69	78	689	86,1	41	47,6
II	95	110	73	120	100	80	69	80	727	91	51	56,1
III	70	106	80	120	96	110	100	110	792	99	50	50,5
IV	75	94	100	110	120	100	100	100	799	99,9	45	45,1

Nous avons groupé en tableaux les valeurs obtenues avec les poissons soignés selon les normes ci-dessus. Nous avons constaté des valeurs allant du simple à plus du double, par exemple de 30 à 80 mouvements des oper-

Respiration
Mouvement des opercules/minute

$$\text{Ecart absolu } \% = \frac{\Delta \text{ max. } 4.100}{\Sigma}$$

TABLEAU 2 T = 20° C

	5'	10'	20'	30'	Σ	Σ 4	Δ max.	Ecart %	
V	96	115	120	100	431	107,7	24	22,2	1
VI	80	30	61	63	244	61	50	82	← 82 %
VII	60	51	60	60	231	57,8	9	15,6	2 ← 15,6 %
VIII	60	46	48	48	202	50,5	14	27,8	
IX	60	68	62	54	244	61	14	23	3
X	53	62	109	100	324	81	56	69,2	
XI	60	70	65	37	232	58	33	56,9	
XIII	67	62	80	67	276	69	18	26,1	

cules par minute. Du point de vue statistique, il est aléatoire de prendre une moyenne dans ces conditions. Malgré cette réserve, nous avons calculé la moyenne arithmétique et à l'aide de la différence maximale l'écart en pourcent de cette moyenne. Les chiffres ainsi obtenus varient de 15,6 à 82 % et, sur 20 poissons, 6 seulement donnent des valeurs se trouvant entre 15 et 25 % pour un essai. (*Tableaux 1 à 3*).

La répétition de l'essai avec les mêmes poissons donne des résultats tout à fait différents.

TABLEAU 3

	5'	10'	20'	30'	40'	Σ	$\frac{\Sigma}{4 (5)}$	Δ max.	Ecart %
XIII	120	109	92	93		414	103,5	28	27,1
XIV	80	100	92	96		368	92	20	21,7
XV	80	80	93	87		340	85	13	15,3
XVI	90	109	120	92		411	102,8	30	29,2
XVII	96	115	100	95	100	506	101,2	20	19,8
XVIII	62	109	83	92	96	442	88,4	47	53,2
XIX	89	100	67	102	73	431	86,2	35	40,6
XX	67	100	120	87	120	494	98,8	53	53,7

4
5
6

Pour examiner si les conditions de vie ont une influence sur la respiration, nous avons procédé aux essais suivants :

Les poissons sont laissés 52 heures à jeun, ils sont ensuite placés pour observation dans des béciers adéquats avec 250 ml. d'eau du robinet à 20° C. Les résultats montrent des écarts de 10,65 à 122,3 %, sans aucune régularité décelable.

Poissons à jeun pendant 52 heures, eau ordinaire
Respiration mouvements opercules/minute

TABLEAU 4

T = 20° C

	5'	10'	20'	30'	Σ	$\frac{\Sigma}{4}$	Δ max.	Ecart %
1	18	72	69	96	255	63,7	78	122,3
2	36	71	36	40	183	45,8	35	76,5
3	32	115	48	83	278	69,5	83	119,5
4	28	71	65	87	251	62,7	59	94,2
5	50	37	80	40	207	51,8	43	83
6	40	65	52	83	240	60	43	71,6
7	75	40	44	57	216	54	35	64,8
8	78	96	100	130	404	101	52	51,5
9	60	60	96	89	305	76,3	36	47,3
10	89	80	86	83	338	84,5	9	10,65
11	69	68	50	73	260	65	23	35,4
12	109	97	96	109	411	103	13	12,6

← 122,3 %

← 10,65 %

Pour vérifier si l'aération avait une influence sur la respiration, nous avons laissé les poissons trois fois 24 heures dans de l'eau non aérée, dépourvue d'*Elodea canadensis*, mais avec leur nourriture habituelle. Les tableaux 5 et 6 montrent que les écarts observés vont de 8,8 à 72,5 %.

Poissons après séjour de 3×24 heures dans de l'eau (env. 10 l)
non aérée et sans *Elodea* ; nourriture habituelle

TABLEAU 5 T = 20° C

	5'	10'	20'	30'	Σ	Σ 4	Δ max.	Ecart %	
13	38	60	44	29	171	42,8	31	72,5	← 72,5 %
14	32	42	60	47	181	45,3	28	61,8	
15	75	67	69	60	271	67,8	15	22,1	
16	48	45	44	45	182	45,5	4	8,8	← 8,8 %

Répétition après 40'

TABLEAU 6 T = 19,6° C

	40'	50'	90'	100'	Σ	Σ 4	Δ max.	Ecart %
13	72	65	60	69	266	66,5	12	18
14	79	96	96	104	375	93,8	25	26,6
15	76	133	78	96	383	95,8	57	59,5
16	60	69	80	111	320	80	51	63,8

Enfin, nous avons laissé séjourner des poissons dans de l'eau non aérée et sans nourriture et nous avons déterminé ensuite le rythme respiratoire. Les tableaux 7 et 8 nous montrent des écarts de 13,5 à 102,1 %.

Poissons conservés dans de l'eau non aérée, sans nourriture
Eau ordinaire

TABLEAU 7 T = 20° C

	5'	10'	20'	30'	Σ	Σ 4	Δ max.	Ecart %	
17	80	92	92	92	356	89	12	13,5	← 13,5 %
18	52	69	44	28	193	48,3	41	84,8	
19	50	80	83	115	328	82	65	79,3	
20	88	115	120	141	464	116	53	45,7	

TABLEAU 8

	Après 60'	Σ	$\frac{\Sigma}{4}$	Δ max.	Ecart %
17	96 141 127 120	484	121	45	40,2
18	22 31 58 30	141	35,3	36	102,1
19	60 65 37 92	254	63,5	55	86,7
20	86 104 56 100	346	86,5	48	55,5

← 102,1 %

c) Conclusions

Le rythme respiratoire du cyprin doré présente de notables écarts. Il est illusoire d'en prendre une moyenne sur un poisson et encore moins sur plusieurs individus. Les caractéristiques de la respiration ne peuvent être prises en considération avec l'ensemble des autres tests, à moins d'une régularisation dans un sens ou dans l'autre. Les conditions de vie normale n'ont que peu ou pas d'influence sur le rythme respiratoire.

4. Action pharmacologique sur le cyprin doré de quelques substances réputées sédatives chez l'homme

a) Teintures de valériane

Nous avons contrôlé la teneur en alcool des teintures utilisées, soit des quatre produits suivants :

1. teinture de valériane Ph.H.V 1954 ;
2. teinture de valériane Ph. H.V 1948 ;
3. teinture de racines sèches ;
4. teinture de racines sèches.

Les teintures 1 et 2 correspondent à une teneur en alcool éthylique de 50 % poids/volume.

Les teintures 3 et 4 contiennent 40 % p/v d'alcool éthylique.

Avant d'examiner l'action de ces teintures sur le cyprin doré, nous avons observé le comportement des poissons dans des solutions alcooliques de même titre.

Les poissons furent introduits dans une eau titrant 5 ‰ p/v. d'alcool éthylique correspondant à la dose utilisée dans nos expériences pendant lesquelles les poissons séjournaient dans une solution aqueuse titrant 10 ‰ p/v de teinture de valériane à 50 % p/v d'alcool éthylique.

Les résultats des essais entrepris sur les poissons I à XII montrent très peu de différence avec leur état normal. Par conséquent, nous avons tenu pour négligeable le rôle de l'alcool éthylique.

TABLEAU 11

Pour les poissons V, VI, VII et VIII répétition du test après 1 h. 30 et 2 h.

Les poissons V et VI ont été trouvés morts le lendemain matin.
(Ils avaient subi deux tests le même jour.)

Test	1 h. 30					2 h. 00				
	V	VI	VII	VIII		V	VI	VII	VIII	
1	100	120	40	109		92	92	120	86	
2	N	N	N	N		N	N	N	N	
3	N	N	N	N		N	N	N	N	
4	N	N	N	N		N	N	N	N	
5	—	—	N	N		—	—	N	—	
6	0	0	0	0		0	0	0	0	
7	—	—	0	0		+	+	0	0	
8	0	0	0	0		0	0	0	0	
9	0	0	0	0		0	0	0	0	

TABLEAU 12

(le surlendemain)

36 heures après le test, les poissons IX à XII sont en vie et se comportent normalement

Test	IX						X						XI						XII					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	57	46	75	75	86	92	57	71	86	100	71	60	71	86	100	71	86	100	71	86	100	71	86	100
2	+	+	N	N	N	N	+	+	+	+	+	N	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	+	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Il y a chaque fois un jour d'écart entre les tests avec les poissons I à IV, puis V à VIII et enfin IX à XII.

Tous les tests de mise en évidence de l'action sédative des substances examinées sur le cyprin doré ont été exécutés simultanément à un essai témoin en solution alcoolique de titre identique à celui de la substance examinée.

La teinture 1 à la dose de 10 ‰ p/v provoque un début de sédation après 20 minutes allant jusqu'à narcose (narkosis = engourdissement) complète après 60 minutes (poissons 13 à 16). (*Tableau 13*)

Les poissons replacés dans de l'eau fraîche reprennent leur activité normale. Le lendemain, ils sont en vie et leur comportement peut être considéré comme normal.

La teinture 2, essayée sur les poissons 17 à 24, donne sensiblement les mêmes résultats. Tous les animaux reprennent leur activité normale dans l'eau fraîche après 45 à 60 minutes.

Nous avons observé lors de ces essais, ainsi qu'ultérieurement avec le lupulin, que plus l'animal est endormi, plus il réagit violemment à une excitation de l'ouïe : les poissons font un saut de carpe assez spectaculaire (cyprin de Kuprinos = la carpe !).

Nous avons fait un premier essai avec la teinture 3, à la dose de 10 ‰ p/v, en ajoutant de l'alcool pour avoir une concentration finale de 5 ‰ p/v. Nous avons obtenu une très faible action sédative (poissons 25 à 28). *Tableau 14*.

Un deuxième essai à la même dose mais sans adjonction d'alcool donnait par contre une excitation très prononcée (poissons 29 à 32). *Tableau 15*.

L'augmentation de la dose à 15 et 20 ‰ p/v (poissons 33 à 36 et 37 à 40) confirma ce résultat. *Tableaux 16 et 17*.

La teinture 4 de même provenance mais fabriquée ultérieurement donna le même résultat à la dose de 10 ‰ p/v (poissons 41 à 44).

TABLEAU 13

Test	13						14						15						16					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	75	71	75	52	48	0	86	75	75	71	71	0	92	84	71	48	55	0	75	37	67	30	28	0
2	+	+	N	=	0	0	+	+	-	=	0	=	+	+	-	=	0	0	+	N	-	=	=	=
3	N	N	-	=	0	0	N	N	=	=	0	0	N	N	=	=	0	0	N	N	=	=	0	0
4	+	+	N	+	+	+	+	+	N	+	+	+	+	+	N	+	+	+	+	+	N	+	+	+
5	N	N	-	0	0	0	N	+	+	-	0	0	N	N	-	0	0	0	+	N	-	+	+	+
6	0	0	-	=	/	/	0	+	+	=	+	/	0	+	+	/	/	/	0	+	+	+	=	0
7	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	/
8	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+
9	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-

Teinture Valériane Ph.H.V. 1954 — 10 °/∞ p/v — T = 20° C — Poissons aérés

Valériane F 326 10 % p/v + 1,1 cc. alcool 95° pour arriver au même titre alcoolique que les teintures précédentes

Très faible action sédatif. T = 20° C. Poissons aérés

[illegible]

TABLEAU 15

Même produit, même essai mais sans adjonction d'alcool. Excitation très prononcée

[illegible]

TABLEAU 16
15 o/oo. Excitation légère

Test	33						34						35						36					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	75	66	100	80	100	92	46	60	100	120	100	92	60	63	92	100	92	100	30	71	86	86	86	80
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 17
20 o/oo. Spasmes respiratoires. Excitation

Test	37						38						39						40					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	2'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	100	92	120	132	120	120	120	120	92	120	120	120	44	45	60	44	76	60	45	75	63	120	71	92
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b) Phénobarbital sodique

Nous avons utilisé les concentrations suivantes :

- a) 0,1 g. par litre ;
- b) 0,5 g. par litre ;
- c) 5 g. par litre (pH 9,1) ;
- d) 10 g. par litre (pH 9,1) ;
- e) 20 g. par litre (pH 9,1).

Lorsque le pH n'est pas spécifié, il est dans le voisinage de la neutralité, entre 6 et 8.

Aux concentrations a) et b), le phénobarbital, au cours d'un essai d'une heure, n'exerce aucune action sur le poisson.

A la concentration c), après une heure, on observe une faible action sédative.

TABLEAU 18
Phénobarbital
sodique
5 ‰ p/v

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	70	70	80	80	100	100
2	N	N	N	N	—	—
3	N	N	N	N	—	—
4	N	N	N	N	—	—
5	N	N	N	N	—	—
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	+	+
9	0	0	0	0	0	0

Il faut prolonger l'essai pendant deux heures et 40 minutes pour que les poissons soient complètement endormis.

A la concentration d), on observe une action sédative accompagnée de troubles de l'équilibre et de la stabilité.

TABLEAU 19
Phénobarbital
sodique
10 ‰ p/v

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	60	40	60	50	120	84
2	N	N	—	—	—	—
3	N	N	N	N	N	—
4	N	N	N	N	N	—
5	N	N	—	—	—	—
6	0	0	—	—	+	++
7	0	0	—	—	—	++
8	—	—	—	—	—	++
9	0	0	0	0	0	—

Mentionnons que deux poissons laissés plus d'une heure dans la solution meurent après 1 h. 15 et 1 h. 20.

A la concentration *e*), l'action sédatrice est forte, mais elle est également toxique : les 5 poissons meurent l'un à 25 minutes, 3 à 40 minutes et le dernier à 50 minutes.

TABLEAU 20
Phénobarbital
sodique
20 ‰ p/v

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	60	90	80	80		
2	N	—	=	0		
3	N	N	—	0		
4	N	N	—	0		
5	N	N	—	0		
6	0	0	++	++		
7	—	—	+	++		
8	0	0	++	++		
9	0	0	—	—		

c) Hydrate de chloral à 5 g. par litre

Action sédatrice marquée. Troubles de l'équilibre apparaissant rapidement.

TABLEAU 21
Hydrate
de chloral
5 ‰ p/v

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	70	60	70	80	80	80
2	N	—	=	—	—	0
3	N	—	—	0	=	0
4	N	—	—	0	0	0
5	0	—	—	0	0	0
6	0	+	+	++	+	/
7	0	0	+	++	++	++
8	0	0	+	++	++	++
9	0	0	+	++	++	++

d) Chloralose à 3,33 g. par litre

Pas d'action sédatrice, action légèrement spasmodique qui provoque des troubles de l'équilibre subsistant encore 24 heures après immersion des poissons dans l'eau fraîche. Un poisson sur trois meurt.

TABLEAU 22
Chloralose
3,33 ‰ p/v

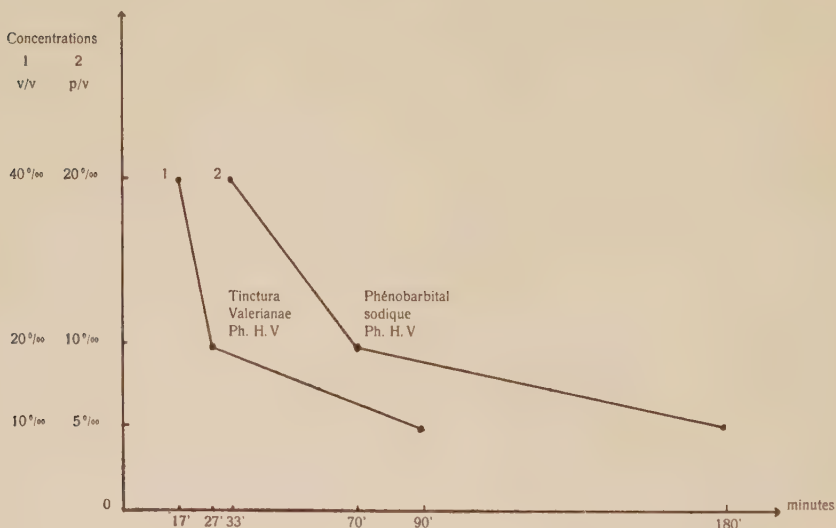
Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	90	80	80	80	80	80
2	N	N	+	N+	N	N
3	N	N	N+	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N
5	N	N	+N	N	N	N
6	0	—	—	—	—	—
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0

e) Bromure de potassium, 10 g. par litre

Aucune action ni sédative, ni toxique.

Les courbes obtenues avec le phénobarbital sodique et la teinture de valériane présentent une analogie. Pour des concentrations de plus en plus faibles tendant vers zéro, l'effet sédatif se manifeste dans un temps de plus en plus long, tendant vers l'infini, alors que pour des doses de plus en plus fortes, tendant vers l'infini, le temps d'apparition de l'effet sédatif tend vers zéro et devient de plus en plus rapide. La courbe possède deux asymptotes (cf. graphique I).

GRAPHIQUE I



f) Conclusions

Ces essais montrent que, dans nos conditions expérimentales, des substances douées d'action sédative sur l'homme exercent une action analogue sur le cyprin doré.

Ils confirment les observations de Fauconnet ⁷⁸, selon lesquelles les teintures de valériane préparées à partir de racines fraîches stabilisées montrent une action sédative prononcée sur le cyprin doré, tandis que les teintures à partir de racines sèches n'ont pas cet effet.

L'action spasmodique non sédative de la chloralose nous paraît inexplicable, à moins de la rattacher à la nature de l'espèce animale considérée.

L'inefficacité du bromure de potassium ne nous surprend pas, sachant que, chez l'homme, les bromures développent leur effet après plusieurs jours seulement.

5. Etude de diverses extractions de lupulin

Pour la clarté de notre exposé, nos essais se subdivisent en deux groupes :

- a) essais préliminaires ;
- b) essais de séparation de l'action sédative et de l'action toxique.

Mentionnons au préalable que toutes les solutions extractives de lupulin, sauf les extraits aqueux, donnent avec l'eau des solutions troubles, présentant un film superficiel, résineux. Dans ces conditions, il est impossible de suivre convenablement les mouvements des poissons.

Nous éliminons les troubles observés par l'utilisation de Tween 20¹ (5 à 10 ‰). Nous mélangeons par agitation le Tween et la solution extractive en quantités égales, puis nous versons le mélange goutte à goutte dans l'eau en agitant vigoureusement. Le Tween 20 peut être administré per os chez l'homme. A la concentration de 5 ou 10 ‰, celle de nos essais, il ne possède aucune action sur le cyprin doré, ainsi que nous avons pu le vérifier nous-mêmes. Par contre, une solution d'extrait de houblon, éclaircie grâce au Tween, possède une action beaucoup plus forte sur le poisson que la même solution trouble sans adjonction de Tween. Pour expliquer ce phénomène, on peut admettre que la dissolution ou la dispersion des principes actifs est augmentée en présence de Tween et qu'il s'ensuit pour le poisson une résorption plus importante des principes actifs.

Nous mentionnerons les expériences où nous n'aurons pas utilisé le Tween 20 pour l'obtention d'extraits limpides.

Dans toutes nos expériences, les poissons sont replacés dans l'eau fraîche au moment où ils présentent la même apparence de narcose qu'avec la teinture de valériane Ph. H.V qui nous sert ainsi de substance de référence.

a) Essais préliminaires

Nous avons préparé une série de macérations de lupulin à la concentration de 20 % dans divers solvants.

Les extractions faites au moyen d'un solvant autre que l'eau ou l'alcool furent concentrées sous pression réduite jusqu'à élimination du solvant ; le résidu fut ensuite dissous dans l'alcool. On éliminait ainsi un solvant doué par lui-même d'une action toxique sur le cyprin doré. Rappelons qu'aux concentrations utilisées, l'alcool éthylique n'exerce pas d'action toxique ou sédative sur le poisson.

Il en résulte que toutes les solutions étudiées sur le cyprin doré sont des solutions aqueuses ou alcooliques.

Ces essais préliminaires ont été réalisés avec un lupulin récolté en 1948 et avec un extrait sec de lupulin du commerce.

¹ Tween 20 = polyoxyéthylène sorbitan monolaurate, agent tensio-actif non ionique, dont le caractère hydrophile est dû à des groupes hydroxyles et oxyéthylènes libres, tandis que la partie lipophile est fournie par une longue chaîne d'acide gras.

1. TABLEAU SYNOPTIQUE DES PRÉPARATIONS

a) Avec un lupulin récolté en 1948

	Mode de préparation	Solvant	Concentration en %	Conservation ° C
A	Macération dans l'eau, puis filtration	Eau distillée	20	20°
I	Macération dans l'eau, puis filtration	Eau distillée	20	5°
B	Macération dans l'alcool 50°, puis filtration	Alcool 50°	20	20°
II	Macération dans l'alcool 50°, puis filtration	Alcool 50°	20	5°
C	Macération dans l'alcool 95°, puis filtration	Alcool 95°	20	20°
III	Macération dans l'alcool 95°, puis filtration	Alcool 95°	20	5°
D	Macération dans l'acétone, puis filtration, évaporation sous pression réduite. Le résidu est dissous dans :	Alcool 95°	40	5°
F	Macération dans l'éther de pétrole, filtration, puis évaporation. Le résidu est dissous dans :	Alcool 95° 90 Eau 10	20	5°
K	Macération dans l'alcool méthylique, puis filtration, évaporation sous pression réduite. Le résidu est dissous dans :	Alcool 95° Eau aa	20	5°

b) Avec un extrait sec du commerce

	Mode de préparation	Solvant	Concentration en %	Conservation ° C
Z ₁	Dissolution dans :	Alcool 95°	5	5°
Z ₂	Trituration dans un mortier et filtration	Eau 98 cc Tween 20 1 cc Alcool 1 cc	2,5	5°

2. ETUDE DE LEUR ACTION SUR LE CYPRIN DORÉ

Macérations A et I : de concentration identique (10 ‰ v/v).

Ces deux préparations sont aqueuses. Elles donnent avec l'eau une solution limpide, sans adjonction de Tween. Elles sont, dans les conditions de notre expérimentation, dépourvues d'action pharmacologique sur le cyprin doré.

Macération B 10 ‰ v/v, selon tableau 24 :

TABLEAU 24

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	30	35	75	95	100	85
2	N	N	N	N—	N—	N—
3	N	N	N—	N—	N—	N—
4	N	N	N—	N—	N—	N—
5	0	—	—	—	—	—
6	0	—	+	+	+	+
7	—	—	+	+	+	+
8	0	+	+	+	+	+
9	0	+	+	+	+	+

Moins sédative et plus toxique qu'une teinture préparée de la même manière (II), mais conservée à 5° C. Deux poissons sur cinq meurent entre 25 et 30 minutes.

Macération II 10 ‰ v/v. Très faible action sédative. Elle provoque de légers troubles de l'équilibre et de la stabilité. Aucun poisson ne meurt.

TABLEAU 25

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	30	40	50	65	70	70
2	N	N	N	N—	N—	—
3	N	N	N	N	—	—
4	N	N	N	N	—	—
5	N	N	N	N	—	—
6	0	0	0	—	—	—
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+

Macérations C et III : de concentration identique (5 ‰ v/v). Ces deux filtrats sont très toxiques. Ils tuent les poissons en moins de 5 minutes, en provoquant quelques spasmes. Pour une plus grande dilution du filtrat C, soit 1 ‰ v/v, l'action spasmodique reste inchangée ; l'action toxique apparaît plus tardivement. Les poissons meurent en 11 minutes.

Macération D 5 ‰ v/v. Préparation très faiblement sédatrice, mais fortement toxique et spasmodique. Les trois poissons ont des spasmes si violents qu'ils sautent hors du bocal. Ils se mettent sur le flanc, en 6 à 7 minutes, puis meurent.

Cette préparation est alors étudiée par dilution :

- a) à 1 ‰ v/v : même action, même toxicité que pour la solution à 5 ‰ v/v ;
 b) à 0,2 ‰ v/v : très faible action sédatrice apparaissant juste après les spasmes qui sont moins violents que précédemment. Les trois poissons retirés de la solution au moment où ils se mettent sur le flanc (22, 25 et 28 minutes) et placés dans l'eau courante, reprennent leur activité normale.

Macération F 5 ‰ v/v. Légère action sédatrice, suivie d'une très forte action spasmodique : les poissons sont d'abord pris d'un tremblement spasmodique, puis de convulsions. Ils se mettent ensuite, après 5 à 8 minutes, sur le flanc. Action très toxique : les trois poissons meurent.

Macération K 5 ‰ v/v. Elle a une action sédatrice faible, mais une action spasmodique et toxique marquées : un poisson est sur le flanc après 8 minutes, les deux autres après 13 minutes. Ils sont retirés immédiatement de l'eau ; l'un des trois meurt néanmoins.

Extraction Z₁ 5 ‰ v/v. Cette solution possède une légère action sédatrice et spasmodique. Elle provoque des troubles de l'équilibre.

TABLEAU 25 bis

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	50	50	55	52	100	40
2	N	N—	N—	S	N	=
5	N	N	N—	—	=	0
6	0	0	—	+	++	++
7	0	—	—	—	+	+
8	0	0	0	0	0	+
9	0	+	+	+	+	+

Extraction Z₂ 5 ‰ v/v. Action comparable à la précédente, mais normalement plus faible car la concentration en extrait sec est inférieure de moitié.

TABLEAU 26

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	50	50	50	80	80	80
2	N	N	N	N	N	—
5	N	N	N	N	—	—
6	0	0	0	—	+	+
7	0	0	0	0	—	+
8	0	0	0	+	+	+
9	0	0	0	0	+	+

La littérature spécialisée mentionnant que l'intoxication par les ions chlore provoque des spasmes semblables à ceux que nous décrivons à propos des extraits de lupulin, nous avons refait les essais avec de l'eau exempte d'ions chlore. Les poissons montraient les mêmes symptômes, les spasmes sont donc bien dus à des principes contenus dans les extraits de lupulin utilisés pour nos expériences.

b) *Conclusions des essais préliminaires*

Ces premiers essais montrent que l'extraction aqueuse de lupulin est dépourvue d'action sur le poisson. L'eau n'est donc pas un bon solvant des principes actifs du lupulin ; l'alcool, l'alcool méthylique, l'acétone, l'éther de pétrole permettent de préparer des extraits dont les principes se révèlent successivement sédatifs, puis toxiques pour le poisson.

Dans la suite de notre étude, nous essayerons, par des séparations successives au moyen de divers solvants, de mettre en évidence l'action sédatrice, en éliminant l'action toxique qui la dissimule partiellement.

c) *Essais de séparation de l'action sédatrice et de l'action toxique*

Nous avons vérifié si un lupulin, déjà épuisé par un solvant, cédait encore des substances actives à un autre solvant.

Comme pour les essais précédents, tous les solvants organiques autres que l'alcool ont été évaporés sous pression réduite et les résidus dissous dans l'alcool.

1. TABLEAU SYNOPTIQUE DES EXTRAITS PRÉPARÉS

	<i>Matière première</i>	<i>Mode de préparation</i>	<i>Solvant</i>	<i>Concentration en %</i>
H	Résidu de D (lupulin extrait par alcool 95°)	Macération dans <i>pentane</i> , filtration, évaporation sous pression réduite. Le résidu est dissous dans :	Alcool 95° 75 cc Glycérine 25 cc	20
W ₁	Résidu de I	Macération dans l' <i>alcool méthylique</i> , filtration, évaporation sous pression réduite, résidu dissous dans:	Alcool 95°	20
W ₂	Résidu de II	Macération dans l' <i>alcool méthylique</i> , filtration, évaporation sous pression réduite, résidu dissous dans:	Alcool 95°	20°
W ₅	Résidu de III	Macération dans l' <i>alcool méthylique</i> , filtration, évaporation sous pression réduite, résidu dissous dans:	Alcool 95°	20
	Résidu de III	Macération dans l' <i>alcool méthylique</i> , filtration, évaporation sous vide. Le résidu mou est traité par l' <i>éther de pétrole</i> . La partie soluble est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissous dans :	Alcool 95°	20
W ₄		La partie insoluble est dissoute dans :	Alcool 95°	20
W ₃			Alcool 95°	20
X ₁	Résidu de A	Macération dans le <i>benzène</i> , filtration, évaporations sous pression réduite, le résidu est dissous dans :	Alcool 95°	20
X ₂	Résidu de B	Macération dans le <i>benzène</i> , filtration, évaporation sous pression réduite, le résidu est dissous dans :	Alcool 95°	20
X ₃	Résidu de C	Macération dans le <i>benzène</i> , filtration, évaporation sous pression réduite, le résidu est dissous dans :	Alcool 95°	20
			Alcool 95°	20

2. ETUDE DE LEUR ACTION SUR LE CYPRIIN DORÉ

Extraction H 5 °/° v/v. Possède une faible action sédatrice dépourvue d'action spasmodique. Elle provoque des troubles d'équilibre qui durent encore quelques heures après avoir remis le poisson dans l'eau fraîche.

TABLEAU 27

Test	5'	10'	20'	30'
1	70	60	60	40
2	N	N	—	=
5	—	—	—	—
6	0	—	++	++
7	+	+	+	++
8	0	—	+	+
9	0	0	0	—

Extraction W₁ 5 °/° v/v. Action sédatrice très faible, spasmes très violents avec troubles de l'équilibre. Elle est très toxique (4 poissons sur 5 meurent).

TABLEAU 28

Test	5'	10'	20'	30'
1	34	32	30	
2	N	N	—	
5	—	—	0	
6	+	+	+	
7	+	+	++	
8	+	+	++	
9	++	++	++	

Extractions W₂ et W₅ 5 °/° v/v. Faible action sédatrice, mais action spasmodique marquée. Les poissons sont sur le flanc après 12 minutes ; placés à nouveau dans l'eau fraîche, ils reprennent leur équilibre.

Extraction W₃ 5 °/° v/v. Faible action sédatrice et faible action spasmodique. Elle provoque des troubles de l'équilibre.

TABLEAU 29

Test	5'	10'	20'	30'
1	50	90	90	
2	N	—	—	
5	—	=	0	
6	0	+	+	
7	+	++	++	
8	—	—	—	
9	+	++	++	

Extraction W₄ 5 ‰ v/v. Aucune action sédative, mais troubles marqués de l'équilibre. Petits spasmes de la bouche et narcose au sortir de l'eau.

TABLEAU 30

<i>Test</i>	5'	10'	20'	30'
1	70	60	64	90
2	N	N	N—	N+
5	N	—	—	—
6	0	—	—	++
7	0	+	+	++
8	0	0	—	+
9	0	—	++	++

Extraction X₁ 5 ‰ v/v. Les poissons subissent une très faible action sédative et spasmodique mais montrent de forts troubles de l'équilibre. Placés dans l'eau fraîche courante, ils reprennent rapidement leur activité normale.

TABLEAU 31

<i>Test</i>	5'	10'	20'	30'
1	40	55	60	60
2	N	N	—	N—
5	N	—	=	=
6	0	—	+	++
7	+	+	+	++
8	—	—	+	+
9	0	—	—	—

Extractions X₂ et X₃ de concentration identique (5 ‰ v/v.). Ces deux extractions ont une action sédative presque nulle, mais elles provoquent de légers spasmes et des troubles très marqués de l'équilibre. Les poissons nagent sur le flanc après 10 à 13 minutes ; placés dans l'eau fraîche, ils reprennent leur état normal.

d) *Conclusions des essais de séparation de l'action sédative et de l'action toxique*

Toutes ces préparations montrent une assez forte toxicité sur le poisson, tandis que leur action sédative est faible ou nulle. Le fait d'épuiser une seconde fois la drogue par un solvant différent de celui utilisé lors d'un premier épuisement ne permet pas de mettre en évidence — tout comme la première fois d'ailleurs — la présence de principes sédatifs dépourvus de phénomènes toxiques.

6. Action pharmacologique des principaux composants du lupulin

Connaissant les principaux composants du lupulin (humulone, lupulone, essence de lupulin) et leur solubilité, il était évident que ces principes se trouvaient dans toutes ou plusieurs des extractions précédentes et que les principes responsables d'une éventuelle action sédatrice du lupulin sur le cyprin devaient être recherchés en procédant à une discrimination plus complète des éléments constitutifs du lupulin.

L'humulone, la lupulone et l'essence de lupulin furent successivement étudiés.

a) *Humulone*

Nous avons préparé l'humulone libre à partir de son sel de plomb *.

1. PRÉPARATION DE L'HUMULONE A PARTIR DE L'HUMULATE DE PLOMB

0,1534 g. d'humulate de plomb équivalant à 0,100 g. d'humulone sont finement dispersés dans 10 ml. de méthanol. On ajoute 3 ml. d'acide sulfurique 2n, en agitant vigoureusement. Il se forme du sulfate de plomb et la couleur jaune de l'humulate disparaît. Cette préparation est traitée avec quatre fois 10 ml. d'hexane, ou de préférence d'éther de pétrole. Après la deuxième extraction, nous ajoutons 10 ml. d'eau distillée à la solution méthylique pour abaisser la solubilité de l'humulone libérée dans l'alcool. Les extraits étherés sont réunis, séchés avec du sulfate de soude et filtrés. On évapore l'éther de pétrole en ayant soin de recouvrir l'humulone avec de l'acide carbonique. Finalement, on la place dans un exsiccateur. L'humulone ainsi préparée est une substance sirupeuse jaunâtre à incolore, pratiquement inodore.

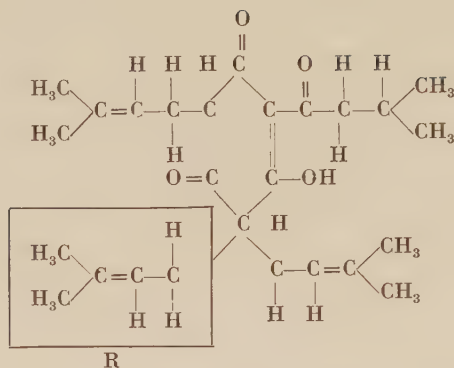
2. PROPRIÉTÉS DE L'HUMULONE

L'humulone ou acide amer α répond à la formule globale $C_{21}H_{30}O_5$ ^{79, 80}, de poids moléculaire 362,3. Elle diffère de la lupulone par les caractères suivants :

	Poids moléculaire	Point de fusion	Activité optique
Lupulone $C_{26}H_{38}O_4$	414,3	(88—) 92° C	inactive
Humulone $C_{21}H_{30}O_5$	362,3	55° C	(α)D = —232°

* Fourni obligeamment par Western Regional Research Laboratory, Albany 6, California (United States Department of Agriculture).

Lupulone (ou acide amer β) :



Humulone (ou acide amer α). Structure analogue, remplacer R par OH.

Soluble dans les solvants organiques usuels. On la cristallise difficilement de l'éther en cristaux de saveur amère et de point de fusion 55°C . A la différence de la lupulone, elle est optiquement active.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -232^{\circ}$ (en solution dans le benzène).

Elle est légèrement soluble dans l'eau bouillante, de laquelle elle se sépare par refroidissement, sous forme d'un précipité laiteux.

3. ACTION DE L'HUMULONE SUR LE CYPRIN DORÉ

Nous avons vu que les macérations aqueuses de lupulin préparées à la température ordinaire étaient dépourvues d'action pharmacologique sur le cyprin doré. Malgré la faible solubilité dans l'eau de l'humulone, il nous parut intéressant de préparer une solution aqueuse saturée d'humulone et d'examiner son activité sur le cyprin.

Plusieurs essais ont montré que l'humulone n'est que très peu soluble dans l'eau chaude et encore moins dans l'eau froide. Lors de la dissolution, la plus grande partie de l'humulone adhère aux parois du récipient. Malgré cette perte, la solution est légèrement colorée en jaune. Un contrôle à l'acétate de plomb révèle qu'une partie du produit est dissoute ; par contre, le résidu séché ne cède plus rien à l'eau. Nous obtenons donc une solution aqueuse saturée d'humulone.

Testée sur le cyprin doré (poissons 249-250 et 253 à 255) cette solution saturée d'humulone n'exerce pas d'action pharmacologique sur le cyprin doré.

Il eût été possible d'augmenter la concentration en humulone en recourant à une solution alcoolique et au Tween 20. Mais nous avons constaté qu'une « pseudo-solution » ainsi préparée ne précipitait plus en

présence d'acétate de plomb : son comportement physico-chimique est donc changé. Dès lors l'étude de l'action pharmacologique de cette association sort du cadre de ce travail.

Pour avoir des indications quantitatives, nous avons alors entrepris de déterminer la quantité d'humulone capable de se dissoudre dans l'eau.

De nombreuses analyses à des pH et des températures variées nous ont donné un résultat moyen de 30 mg. d'humulone par litre avec des valeurs extrêmes de 16 et 45 mg. d'humulone par litre.

Le principe de la détermination était le suivant : 0,1 g. environ d'humulone fraîchement préparée est mis dans 1 l. d'eau et porté à ébullition. La solution ainsi obtenue est refroidie à la température ambiante. Nous prélevons 100 ml. que nous portons à 60° C et nous ajoutons de l'acétate de plomb R en léger excès (contrôle). Le précipité jaune est filtré sur un filtre en verre, séché et pesé.

4. CONCLUSION

Une solution aqueuse saturée d'humulone n'exerce pas d'action pharmacologique sur le cyprin doré.

b) *Lupulone*

Nous avons travaillé avec une lupulone cristallisée, partie en très gros cristaux, partie en aiguilles fines légèrement jaunâtres. Le produit était conservé en ampoules sous azote. Nous avons transvasé la lupulone dans deux tubes à essais, remplis au préalable de gaz carbonique. L'un des deux tubes fut vidé de son gaz et scellé, l'autre fut fermé avec un bouchon en caoutchouc enduit de collodion pour être facilement manipulable.

1. PROPRIÉTÉS DE LA LUPULONE

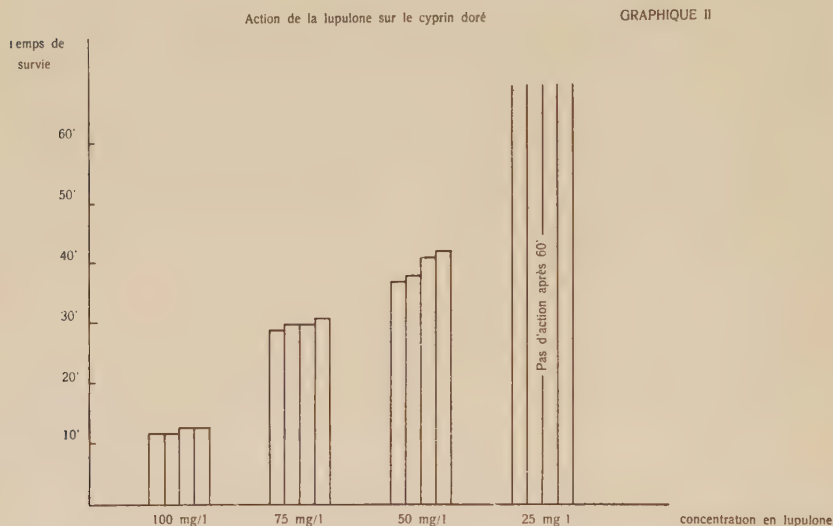
La lupulone ou acide amer β dont la formule globale $C_{26}H_{38}O_4$ correspond au poids moléculaire 414,3 possède la formule développée suivante : cf. page 56.

Cristaux rhombiques de couleur jaune clair. Pas d'odeur caractéristique. Point de fusion : 92°. Plus facilement soluble dans l'eau que l'humulone (environ 100 mg/l.). La solution est incolore et pratiquement sans odeur. Facilement soluble dans l'alcool méthylique et dans l'alcool éthylique, dans l'éther de pétrole et dans la plupart des solvants organiques. Pas de réaction avec l'acétate de plomb. La solution dans l'eau doit se préparer en chauffant à ébullition.

2. ACTION PHARMACOLOGIQUE DE LA LUPULONE SUR LE CYPRIN DORÉ

Comme pour l'humulone, des solutions ont été préparées pour examen sur le cyprin doré.

Un premier essai avec 100 mg. par litre a montré une violente action sur le cyprin. Des solutions plus faibles ont alors été préparées. Les résultats sont indiqués graphiquement en II et concernent les poissons 257 à 272.



3. CONCLUSION

Nos observations montrent que *l'action de la lupulone sur le cyprin doré est toxique et non sédative.*

c) Etude de l'huile essentielle de lupulin et de l'eau distillée de lupulin

1. MODE DE PRÉPARATION

Nous avons extrait l'essence de lupulin par entraînement à la vapeur d'eau.

Cette opération nous a fourni une fraction de tête jaune clair présentant, lorsqu'on l'examine sous une grande épaisseur, de beaux reflets verdâtres, et une fraction de queue, dont la couleur brun jaune la distingue nettement de la première fraction.

Nous avons complété nos observations par l'étude :

- a) de l'eau distillée de lupulin ;
- b) d'une extraction alcoolique de lupulin débarrassée de son huile essentielle par traitement à la vapeur d'eau ;
- c) des eaux-mères dans lesquelles le lupulin a macéré pendant l'entraînement à la vapeur d'eau.

2. TABLEAU SYNOPTIQUE DES PRÉPARATIONS EFFECTUÉES

	<i>Matière première</i>	<i>Mode de préparation</i>	<i>Solvant</i>
S ₁	Lupulin 1948	Essence recueillie au début de l'entraînement à la vapeur d'eau. Essence jaune-vert clair	Eau Eau Alcool 95°
S ₂	Lupulin 1948	Essence recueillie à la fin de l'entraînement à la vapeur d'eau. Essence brune	
S ₃	Lupulin 1951	Essence recueillie au début de l'entraînement à la vapeur d'eau. Essence jaune-vert clair	
L	Lupulin 1948	Entraînement à la vapeur d'eau ; l'eau distillée est alors séparée de l'essence	
M	Lupulin 1948	Eau dans laquelle le lupulin a cuit pendant l'entraînement à la vapeur d'eau	
G	Lupulin 1948 débarrassé de son essence par entraînement à la vapeur d'eau	Macération dans l'alcool 95°	

3. ACTION SUR LE CYPRIN DORÉ

Essence S₁ jaune clair de lupulin 1948 : 4 gouttes/1000 ml. Action sédatrice marquée. Les poissons ne sont pas endormis, mais « ralentis ». Ils vacillent fortement et ont de très légers spasmes. Ils ne se mettent pas sur le flanc. Une essence de lupulin 1951 (S₃) a, à la même dose, une action tout à fait semblable.

TABLEAU 32

Essence S₁ de
lupulin 1948
4 gouttes ‰

<i>Test</i>	5'	10'	20'	30'
1	30	20	20	20
2	N	=	=	=
5	N	=	=	=
6	—	—	—	+
7	+	+	++	++
8	+	+	++	++
9	+	+	+	+

Essence brune S₂ de lupulin 1948 : 4 gouttes/1000 ml. L'essence semble légèrement toxique, elle provoque des spasmes, les poissons se mettent sur le flanc. Placés dans l'eau fraîche courante, ils reprennent leur état normal.

TABLEAU 33

Essence S₂ de
lupulin 1948
4 gouttes ‰

Test	5'	10'	20'	30'
1	40	20	10	
2	N	=	=	
5	N	—	0	
6	—	—	++	
7	—	—	++	
8	—	—	++	
9	+	+	+	

Eau distillée de lupulin : L. Action sédative très marquée. Elle endort les poissons en 3 à 5 minutes et est dépourvue d'action toxique. Pas de spasmes, pas de mort. Placés dans l'eau fraîche courante dès qu'ils sont endormis, les poissons se réveillent rapidement, en 10 minutes environ.

Eau distillée de lupulin diluée cinq fois (sans tween) : Les poissons sont calmés, mais non endormis. Ils sont immobiles, mais non sur le flanc, et font de temps à autre quelques mouvements.

TABLEAU 34

Eau distillée
de lupulin
diluée 5 fois

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	25	20	45	50	50	50
2	N	—	—	=	=	=
5	N	—	0	=	=	=
6	0	—	—	—	—	—
7	0	—	+	+	+	++
8	—	—	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+

Eaux-mères M pures. Aucune action sédative, seulement une légère action spasmodique.

TABLEAU 35

Eaux-mères M
non diluées

Test	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	75	100	80	75	70	70
2	NS	NS	NS	NS	N	N
5	N	—	—	—	N	N
6	0	—	+	+	—	—
7	0	—	—	0	0	0
8	0	—	—	—	—	—
9	0	—	—	—	—	—

Résidu de distillation G 5 ‰ v/v. Extrait très toxique : provoque des spasmes et des troubles de l'équilibre. Les poissons sont sur le flanc en 8 minutes. Placés immédiatement dans l'eau fraîche courante, ils reprennent vie. L'un des poissons, ayant séjourné 12 minutes dans la solution, meurt.

4. CONCLUSION

L'essence de lupulin a une action sédative marquée dans les conditions de l'expérience ; l'eau distillée de lupulin, probablement grâce à l'essence solubilisée qu'elle contient, est aussi nettement sédative. Ces deux fractions sont dépourvues de toxicité, exception faite de quelques troubles d'équilibre ; seule l'essence brunâtre retirée à la fin de l'entraînement à la vapeur d'eau a une légère action spasmodique. Le lupulin, débarrassé de son essence, perd son activité sédative, mais conserve intégralement sa toxicité.

Cette toxicité semble due à un principe non volatil et thermostable puisqu'il n'est pas détruit au cours des 3 heures de chauffage à la température d'ébullition pendant lesquelles s'effectue l'entraînement de l'essence par la vapeur d'eau.

Tableau-résumé de l'action du lupulin sur Carassius Auratus

Extrait	cc/L	Action sédative	Action toxique			Morts
			Spasmes	Troubles de l'équilibre	Poisson sur le flanc après	
I	10	0	0	0		
A	10	0	0	0		
II	10	+0	+0	+0		
B	10	+0	+0	+0		2/5
III	5	+	+	+	5'	5/5
C	5	+	+	+	5'	3/3
C	1	+0	+	+	11'	2/3
D	5	+0	+++	+	6'- 7'	3/3
D	1,7	+0	+++	+	6'- 7'	3/3
D	1	+0	+++	+	6'- 7'	3/3
D	0,2	+0	++	+	25'-28'	
K	5	+	++	++	7'	1/3
F	5	+	+++	++	6'	3/3
Z ₁	5	+0	+0	+		
Z ₂	5	+0	+0	+		
H	5	+	0	++	30'-35'	
W ₁	5	+0	+++	++	25'	4/5
W ₂ } W ₅	5	+	++	+	10'-11'	
W ₃	5	+	+	+		
W ₄	5	0	+0	++		
X ₁	5	+0	+0	++		
X ₂	5	+0	+	++	10'-13'	
X ₃	5	+0	+0	+	10'-13'	

Extrait	cc/L	Action sédatrice	Action toxique			Morts
			Spasmes	Troubles de l'équilibre	Poisson sur le flanc après	
S ₁	4 gouttes	++	+0	++	35'-40'	
S ₂	4 gouttes	++	++	++	20'-25'	
S ₃	4 gouttes	++	+0	++	25'-40'	
L	1000	+++	0	0	3'- 5'	
L dilué	200	+	0	0		
M	1000	0	+	0		
G	5	++	+	++	8'	1/3

Explication des signes :

- 0 = aucune action
- +0 = très faible action
- + = faible action
- ++ = forte action
- +++ = très forte action

7. Mise en évidence d'un alcaloïde

Nous mentionnons ici à titre documentaire la recherche qualitative d'un éventuel alcaloïde dans le lupulin. Nous avons procédé, par chromatographie sur papier de teintures de lupulin, de la manière suivante :

Prendre du papier spécial Watman n° 1 que l'on découpe avec précaution en rectangles appropriés sur lesquels on tire à 3 cm. du bord horizontal un trait au crayon. Sur ce trait on porte de 4 en 4 cm. des points de repère et sur chacun des points, aussi nombreux qu'il y a de teintures à essayer, on pose une goutte de chacune des sept teintures suivantes : I, II, III, B, D, H, W₁, X₃.

Placer ensuite le papier maintenu en forme de manchon cylindrique par deux agrafes, dans un bocal adéquat, obturé par un papier cellophane imperméable.

Au fond de ce bocal se trouve une solution aqueuse ammoniacale saturée auparavant de pentane et formant une couche épaisse d'un centimètre.

On laisse la solution monter par capillarité dans le papier de telle façon qu'après 3 heures environ elle ait imprégné tout le manchon de papier.

Sortir le papier, le faire sécher avec soin, puis l'imprégner complètement de solution de Dragendorff modifiée pour tenter de mettre en évidence l'alcaloïde par la coloration rouge ou orangée caractéristique que ces substances donnent avec ce réactif.

La sensibilité du réactif de Dragendorff est bonne, à condition de l'employer en milieu acide. C'est la raison pour laquelle Amwar Hakim ⁸¹ créa le réactif de Dragendorff modifié, dont la formule est la suivante :

Réactif de Dragendorff (iodure de Bi et de K)	20,0
Acide acétique	20,0
Eau distillée	60,0

Plusieurs chromatogrammes nous ont permis d'observer une réaction nettement positive avec les teintures III, B, H et W₁.

Nous avons noté que les teintures doivent être exemptes de Tween 20 qui donne avec le réactif de Dragendorff un précipité orange abondant déjà à la concentration de 1 %.

B. INFLUENCE DU TEMPS SUR LES PRÉPARATIONS SÉDATIVES DE LUPULIN

A la suite des observations précédentes, nous avons cherché à connaître quelle pouvait être l'influence du temps sur les propriétés sédatives des eaux distillées de lupulin.

Nous avons choisi des eaux distillées de lupulin préparées en mai 1952 et conservées à l'obscurité sans précautions spéciales dans des flacons convenablement bouchés. Ces mêmes préparations ont été essayées sur le poisson en octobre 1954, soit plus de deux ans après leur fabrication.

1. Action sur le cyprin doré

Les essais portent sur les poissons 49-52.

En une minute, les poissons sont nimbés d'un voile bleuâtre. L'action sédatrice est très forte et après 10 minutes, le rythme respiratoire, à la 5^e minute fortement augmenté, retombe à la moitié; après 18 minutes, deux des poissons ne font plus que quelques mouvements de temps à autre, tandis que les deux autres semblent très fortement calmés. Après 20 minutes, les animaux sont remis dans l'eau fraîche. La couche de mucus bleu s'enlève aux endroits où le poisson est touché avec les doigts (cyprin nimbé, odeur forte). Tous les poissons meurent.

TABLEAU 36

2. 6. 1954. Eau distillée de lupulin préparée deux ans plus tôt (27. 5. 1952) et conservée à la température ordinaire en présence de l'oxygène de l'air résiduel se trouvant dans le flacon

Test	49						50						51						52					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	133	59	~	0			120	60	~	0			100	46	~	0			86	67	~	0		
2	=	0	0				0	=	0				0	=	0				0	=	0			
3	0	0	0				0	0	0				0	0	0				0	0	0			
4	+	0	0				—	0	0				=	0	0				—	0	0			
5	=	0	0				=	0	0				=	0	0				=	0	0			
6	++	/	++				+	/	++				+	/	++				+	/	++			
7	++	++	++				++	++	++				++	++	++				++	++	++			
8	++	++	++				++	++	++				++	++	++				++	++	++			
9	+	+	++				+	+	++				+	+	++				+	+	++			

Poissons mis dans l'eau fraîche — pas de retour à la vie.

2. Comparaison des résultats obtenus à deux ans d'intervalle

Action sédatrice très forte, mais également très toxique. Les poissons replacés dans de l'eau fraîche dès qu'ils ont la même apparence de narcose qu'avec la teinture de valériane, ne reprennent pas vie, mais meurent *sans spasmes ou autres réactions violentes*.

Les résultats obtenus deux ans auparavant (juin 1952) avec la même substance, immédiatement après sa préparation, indiquent une action sédatrice très marquée, poissons endormis en 3 à 5 minutes, sans manifestation toxique, sans spasme, sans entraîner la mort. Placés dans l'eau fraîche courante dès qu'ils sont endormis, les poissons se réveillent rapidement, soit environ après 10 minutes.

3. Conclusion

Le vieillissement de l'eau distillée de lupulin entraîne une diminution de l'action sédatrice, accompagnée d'une augmentation de la toxicité.

C. RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE L'ACTION PHARMACOLOGIQUE DU LUPULIN ET SON AGE DE CONSERVATION

Après avoir vérifié que l'essence fraîche non résinifiée et l'eau distillée fraîche de lupulin, cette dernière par l'essence qu'elle contient, sont responsables de l'action sédatrice du lupulin sur le cyprin doré, nous avons cherché à établir s'il existait une relation entre l'action sédatrice du lupulin sur le poisson et son âge de conservation.

La méthode d'entraînement de l'essence par la vapeur d'eau nous parut encombrante et longue pour un test rapide au laboratoire.

Nous avons alors fait le rapprochement avec une boisson bien connue, réputée sédatrice, dans la fabrication de laquelle le houblon joue un rôle important : *la bière*.

1. Essais préliminaires

Lors de la fabrication de la bière, le houblon est traité par ébullition avec l'extrait de malt, auquel il cède ses vertus sédatrices.

Pour la commodité de l'exposé, nous appellerons « décoctions » les solutions obtenues en faisant bouillir le lupulin.

Un premier essai en chauffant à ébullition 10 g. de lupulin 1948 dans 1 l. d'eau nous a montré que l'activité spontanée des poissons (53-56) placés dans ce liquide filtré et refroidi à 20° C était presque nulle après 10 minutes en même temps qu'apparaissaient quelques spasmes.

Les quatre cyprins replacés dans l'eau fraîche moururent à la 13^e minute: la concentration paraissait trop forte.

Lupulin 1948 — décoctions

Eau ordinaire T = 20° C
pH = 5

TABLEAU 37

Décoction lupulin 1948 10 ‰ p/v
Après 13' les poissons replacés dans de l'eau fraîche meurent

Test	53			54			55			56		
	5'	10'	13' 30'	5'	10'	13' 30'	5'	10'	13' 30'	5'	10'	13' 30'
1	101	S	S	5	S	S	75	S	S	92	S	S
2	=	0	S	—	0	S	=	=	S	—	=	S
3	—	=		—	=		—	=		—	=	
4	—	=		—	0		—	0		—	0	
5	=	0		=	0		=	0		=	0	
6	—	/		—	/		—	++		—	/	
7	+	++		+	++		+	++		+	++	
8	+	++		+	++		+	++		+	++	
9	0	.	++	0	.	++	0	.	++	0	.	++

Nous avons alors prélevé 200 ml. de cette solution à 10 ‰ de lupulin 1948, soit l'équivalent d'une solution préparée directement à partir de 2 g. de lupulin 1948. Nous avons complété ces 200 ml. jusqu'à 1 l. avec de l'eau : le résultat sur le cyprin doré fut nul (tableau 38, p. 67).

Une solution préparée directement avec 2 g. du même lupulin tuait par contre trois poissons sur quatre après 13 et 20 minutes, tandis que le quatrième survivait encore après 23 minutes, lorsque l'on avait soin de le placer dans de l'eau fraîche avant l'apparition des spasmes annonciateurs de la mort (poissons 61-64 ; tableau 39, p. 67).

Un essai de dilution avec 500 ml. de la solution de lupulin 1948 à 2 ‰ et 500 ml. d'eau (équivalant à une concentration de 1 g. de lupulin par litre) nous donnait à nouveau un résultat nul (poissons 65-68).

Une solution préparée directement à partir de 1 g. de lupulin 1948 par litre nous donnait un temps de survie de 50 à 60 minutes (poissons 69-72). Ce temps étant considéré comme un maximum pour les essais, nous avions donc atteint la concentration limite pour le lupulin 1948 envisagé.

TABLEAU 38

Essai avec 200 ml. de la décoction précédente complétée au litre soit l'équivalent d'une décoction de 2 g. de lupulin 1948 au litre : 2 ‰ p/v

Test	57						58						59						60					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	76	48	30	48	48	60	109	109	75	75	96	75	75	109	86	96	86	75	75	96	60	96	75	96
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	.	.	.	0	0	0	.	.	.	.	0	0	0	.	.	.	0	0	0	.	.	.	0

Dilution de décoction correspondant à lupulin 2 ‰ p/v = pas d'action.

TABLEAU 39

Spasmes de 61 et 64 à la 13^e minute = mort ; 63 mort après 20' ; 62 sorti après 23', survit.

Test	61						62						63						64					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	80	~0					40	120	120				46	100	S				80	15				
2	N	OS					N	—	=				N	—	S				N	OS				
3	—	—	=	N			—	=	0				—	=	0				—	—	=			
4	—	—	N	+			—	N	+	+			—	N	+	+			—	—	N			
5	—	=					—	=	+				—	=	=				—	—	=			
6	+	/					0	+	+	+	/		—	+	+	+	/		0	/				
7	—	+	+				—	+	+	+	+		0	+	+	+	+	—	—	+	+			
8	—	+	+				—	+	+	+	+		0	+	+	+	+	—	+	+				
9	0	+	+				0						0	.	+	+	+	0	+	+				

Décoction lupulin 1948 2 ‰ p/v = 3 poissons sur 4 meurent !

2. Discussion

Il est évident que l'action observée est liée à la solubilité des principes actifs du lupulin.

Les résultats précédents signifient qu'au-delà d'une certaine concentration, il n'y a plus solubilisation dans l'eau des principes actifs.

Par conséquent, quelle que soit la concentration de départ en lupulin, tant que les principes actifs y contenus sont en proportion supérieure à ce que la quantité d'eau présente peut dissoudre, il y a toujours même teneur en principes actifs et par suite même action pharmacologique.

3. Préparation de « décoctions »

Ayant ainsi délimité la concentration en lupulin pour l'essai sur le cyprin doré, nous avons procédé de la manière suivante pour tous nos essais.

Dans un récipient émaillé, nous versons 1 l. d'eau du robinet, nous pesons sur une balance à tarer précise 1 g. de lupulin et le versons sur l'eau. Le tout est ensuite chauffé jusqu'à température d'ébullition et maintenu à cette température pendant 20 secondes en brassant à l'aide d'une baguette de verre.

Nous refroidissons ensuite dans l'eau courante jusqu'à 20° C et filtrons à travers un filtre Greens n° 798 $\frac{1}{2}$ de 18,5 cm. dans un cylindre gradué d'un litre. Le filtrat est versé dans un bécher d'un litre et porté à la température de 20° C pour être ensuite distribué dans les béchers d'essai.

4. Action sur le cyprin doré

Pour avoir des valeurs comparables et reproductibles, nous avons choisi comme point final de nos observations non pas l'apparition de la narcose, qui peut donner lieu à des interprétations diverses, mais la mort du poisson. Ce moment est facile à observer, d'autant plus qu'il est généralement précédé ou accompagné de spasmes violents pendant 1 à 3 minutes. Ces spasmes résultent du procédé de « décoction » employé, car il ne sépare pas les principes toxiques des principes sédatifs.

Pour nos essais, nous disposions des matières premières suivantes, provenant toutes d'Allemagne :

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. Lupulin 1948 | 4. Lupulin 1951 |
| 2. Lupulin 1949 | 5. Lupulin 1952 |
| 3. Lupulin 1950 | 6. Lupulin 1953 |

Test	69						70						71						72					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	80	120	80	92	92		70	43	58	60	95	80	52	34	50	75	100	100	86	100	70	70	75	100
2	N	N	+	—	—	—	N	N	—	—	N	—	N	N	—	—	—	—	N	N	+	—	—	—
3	—	N	—	N	—	—	—	N	—	—	—	—	—	N	—	—	—	—	—	N	—	—	—	—
4	N	+	+	—	—	—	N	+	+	—	—	—	N	+	+	—	—	—	N	+	+	—	—	—
5	N	N	—	N	—	—	N	N	—	—	—	—	N	N	—	—	—	—	N	N	—	—	—	—
6	0	0	—	+	+	/	0	0	—	—	+	/	0	0	—	—	+	/	0	0	—	—	+	+
7	0	0	—	—	+	+	0	0	—	—	+	+	0	0	—	—	+	+	0	0	—	—	+	+
8	0	0	—	—	+	+	0	0	—	—	+	+	0	0	—	—	+	+	0	0	—	—	+	+
9	0	.	.	.	.	.	0	.	.	.	.	.	0	.	.	.	.	.	0	.	.	.	.	.

Poissons 69 † à la 51^e minute
70 et 71 † à la 65^e minute moyenne 60'
72 survit

TABEAU 41

1949. Décoctions 1 ‰ p/v

Test	73						74						75						76					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	120	92	92	100			24	60	120	80			15	92	120	133			45	92	92	27		
2	N	N	—	0	0		N	—	—	0			N	—	—	0			N	N	—	—	0	
3	N	N	—	0	0		N	N	—	0			N	N	—	0			N	N	—	—	0	
4	N	+	—	—	S		N	—	—	0			N	—	—	0			N	—	—	—	0	
5	—	—	—	0	0		—	—	—	0			—	—	—	0			N	—	—	—	0	
6	—	—	+	+	/		—	+	+	+	/		—	+	+	+			—	+	+	+	/	
7	—	+	+	+	+		—	+	+	+	+		—	+	+	+			—	—	—	+	+	+
8	—	—	+	+	+		—	—	+	+	+		—	—	+	+			—	—	—	+	+	+
9	0	.	.	.	.		0	.	.	.	.		0	.	.	.			0	.	.	.	.	.

Poissons 73, 74, 76 † à la 35^e minute moyenne 35'
75 survit

La mort est constatée dans l'eau fraîche.

TABLEAU 42
1950. Décoctions 1 ‰ p/v

Test	77						78						79						80					
	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	28'	45'	60'
1	92	20	80	0			25	82	110	0			40	71	92	86			53	71	120	0		
2	N	N	N	0			N	N	—	0			N	N	—	—	—	—	N	N	—	0		
3	N	—	—	—	—	—	N	—	—	0			N	—	—	—	—	—	N	—	—	0		
4	N	—	—	S	0		N	—	—	0			N	—	—	S			N	—	—	0		
5	N	—	—	0			N	—	—	0			N	—	—	0			N	—	—	0		
6	—	—	—	+	/		—	—	+	+	/		—	—	+	/			—	—	+	/		
7	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+		—	—	+	+			—	—	+	+	+	+
8	0	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+		—	+	+	+			—	+	+	+	+	+
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

moyenne 30'

Poissons 77 † à la 31^e minute
78 † à la 30^e minute

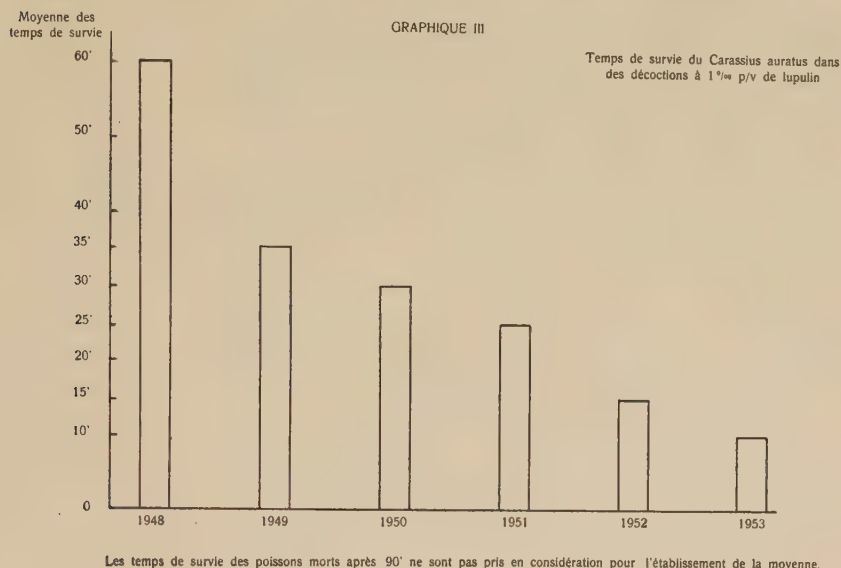
TABLEAU 43
1953. Décoctions 1 ‰ p/v

Test	89						90						91						92					
	5'	9'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
1	32	0					65	0					100	132					80	0				
2	—	0					—	0					—	—					—	0				
3	—	0					—	0					—	0					—	0				
4	—	0					—	0					—	0					—	0				
5	—	0					—	0					—	0					—	0				
6	+	+	/				+	+	/				+	+	/				+	+	/			
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+

moyenne 10'

Poissons 89 † à la 9^e minute
80 † à la 11^e minute

Nous en avons fait des décoction à 1 ‰, que nous avons essayées systématiquement sur le cyprin. Les valeurs obtenues sont exposées dans les tableaux 40 à 43 (pages 69 et 70) et sur le graphique III.



5. Discussion

Il ressort des valeurs précédentes une proportionnalité entre la survie du poisson et l'âge du lupulin, ce qui nous permet de suggérer que l'utilisation de la décoction de lupulin pourrait être une méthode d'appréciation pour le lupulin.

Ce test présenterait l'avantage d'être simple et pratique, d'utiliser très peu de substance (1 g. pour une série de quatre poissons) et de donner des résultats reproductibles.

C'est cette hypothèse que nous avons cherché à vérifier en nous procurant une série d'échantillons de lupulin de qualité variable mais de la même période.

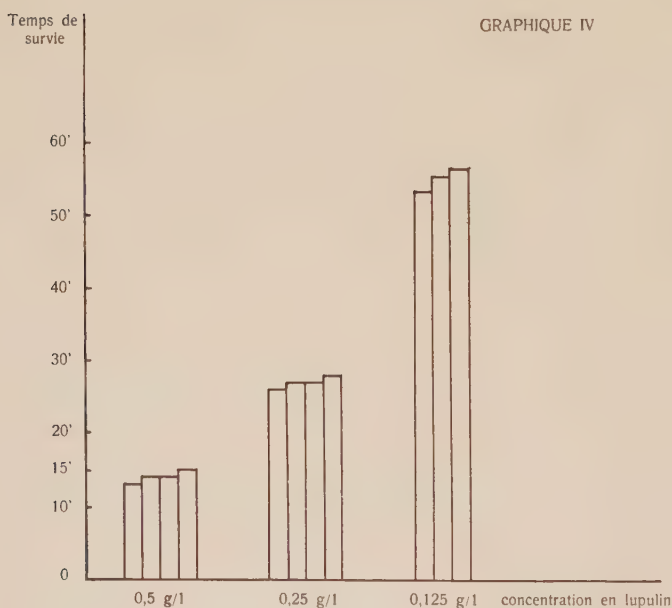
Nous en avons préparé des décoctions pour les essayer sur le cyprin doré et nous avons comparé les résultats obtenus avec les indications de qualité et de prix. Nous avons obtenu huit échantillons dont les numéros 1 et 2 concernent des lupulins de 1953. L'année de production des numéros 3 à 5 ne nous est pas connue, le numéro 6 manque, les numéros 7 et A sont des lupulins de 1954. Leur analyse a été effectuée selon les prescriptions de la pharmacopée helvétique V et porte sur l'examen microscopique et la détermination des cendres (Liste 1, p. 73).

6. Détermination de la quantité optimum de lupulin par litre de décoction

Pour obtenir des valeurs comparables et reproductibles, il est important d'avoir un temps de survie des poissons ne dépassant pas une heure. D'autre part, la durée de l'essai doit être la plus longue possible, pour que de petites différences de qualité puissent être éventuellement enregistrées.

Pour déterminer la quantité *optimum* de lupulin par litre de décoction, nous avons procédé de la manière suivante :

Une première décoction à 0,5 g/l. de l'échantillon A nous donne un temps de survie de 15 minutes. Nous avons fait des décoctions selon la dilution géométrique, ce qui amenait le temps de survie à 25 et 53 minutes et demie (graphique IV).



Hochprima Lupulin année 1954, 13 octobre 1954 N° A
Karel Pechen; Wolnzach-Hallertan (Obb.)

LISTE N° I
Echantillons de lupulin utilisés pour nos essais

<i>Fournisseur</i>	<i>Echant. N°</i>	<i>Fr. suisses /kg</i>	<i>Remarques</i>	<i>Analyses selon Ph. H.V. (critère : cendres < 12 %)</i>	<i>N°</i>
Essencia (Winterth.)	459	19.50	Ia1953HP	bon	1
Essencia (Winterth.)	469	25.—	Ia1953HJ		2
Jugolek (Belgrade)	463	35.—	extra 2344	meilleur	3
Jugolek (Belgrade)	462	25.40	prima 2345	bon	4
Jugolek (Belgrade)	470	19.30	secunda 2346	non conforme	5
W. Ruf (Winterth.)	460	16.60	1 ^{re} qualité (H.-Pflanzen)	assez bon	6
K. Pechen (Wolnzach)	458	26.10		non conforme	7
K. Pechen (Wolnzach)			Hochprima lupulin 1954 13.10.54		A

Nous avons alors choisi la concentration de 0,25 g. de lupulin par litre. Les échantillons 1 à 5, 7 et A ont été essayés à cette concentration sur les poissons 177 à 200.

Les résultats de ces essais sont indiqués sur le graphique V. Il en ressort surtout en ce qui concerne les lupulins n°s 3 à 5 que l'action de 0,25 g/l. est trop faible pour permettre des conclusions.

Nous avons répété les essais avec une dose de 0,5 g. par litre. Les valeurs observées sont indiquées sur le graphique VI (poissons 201-240).

7. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats se réfère à l'hypothèse que l'essai de décoctions de lupulin sur le cyprin doré donne des valeurs comparables, et que ces valeurs expriment la qualité des lupulins essayés.

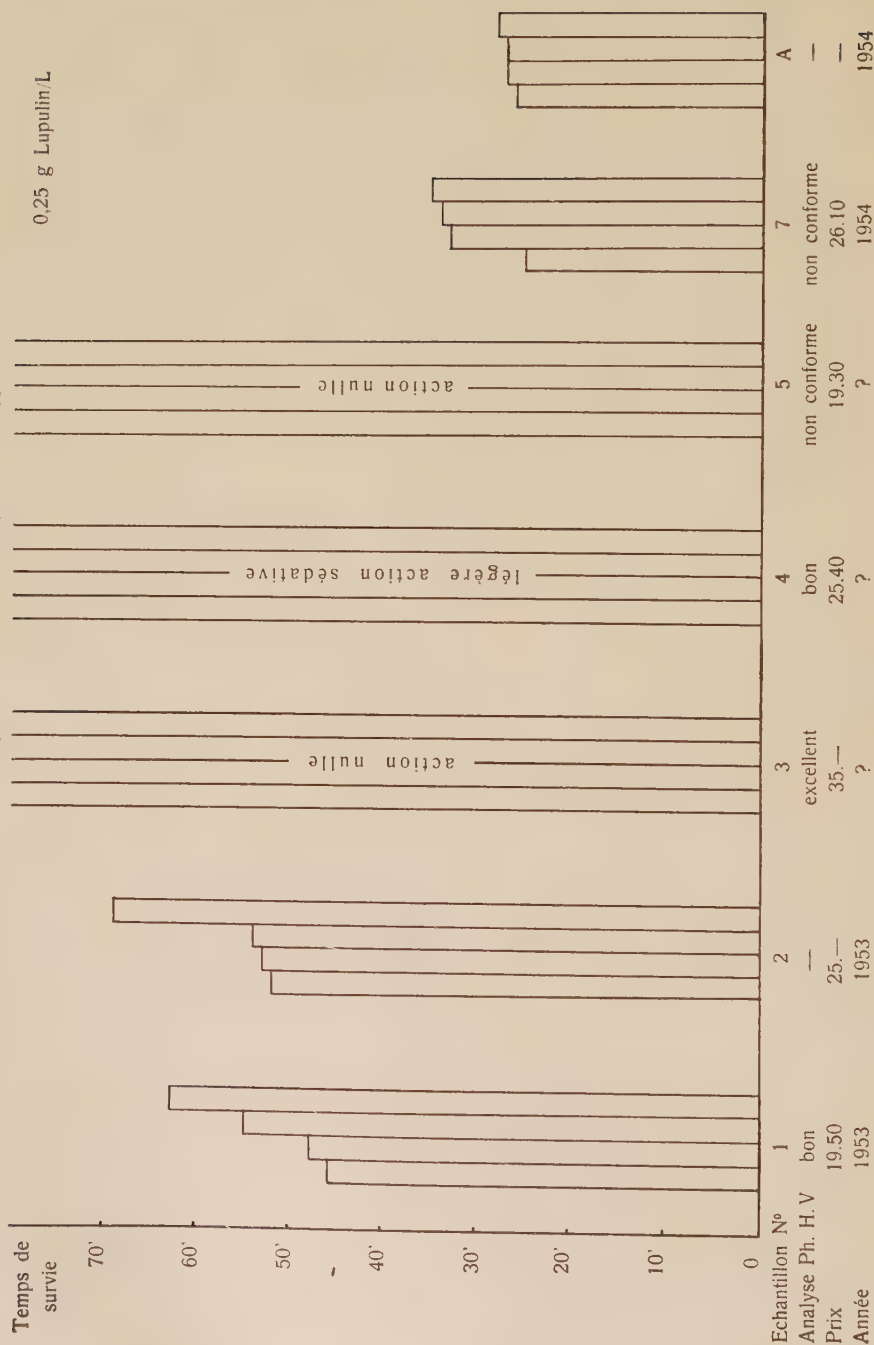
Echantillon n° 1 (1953)

Ce lupulin est conforme aux critères de la Pharmacopée helvétique V. Le test sur cyprins montre que son activité n'est que légèrement inférieure à un lupulin de 1954 (A).

GRAPHIQUE V

Poissons 177 à 200

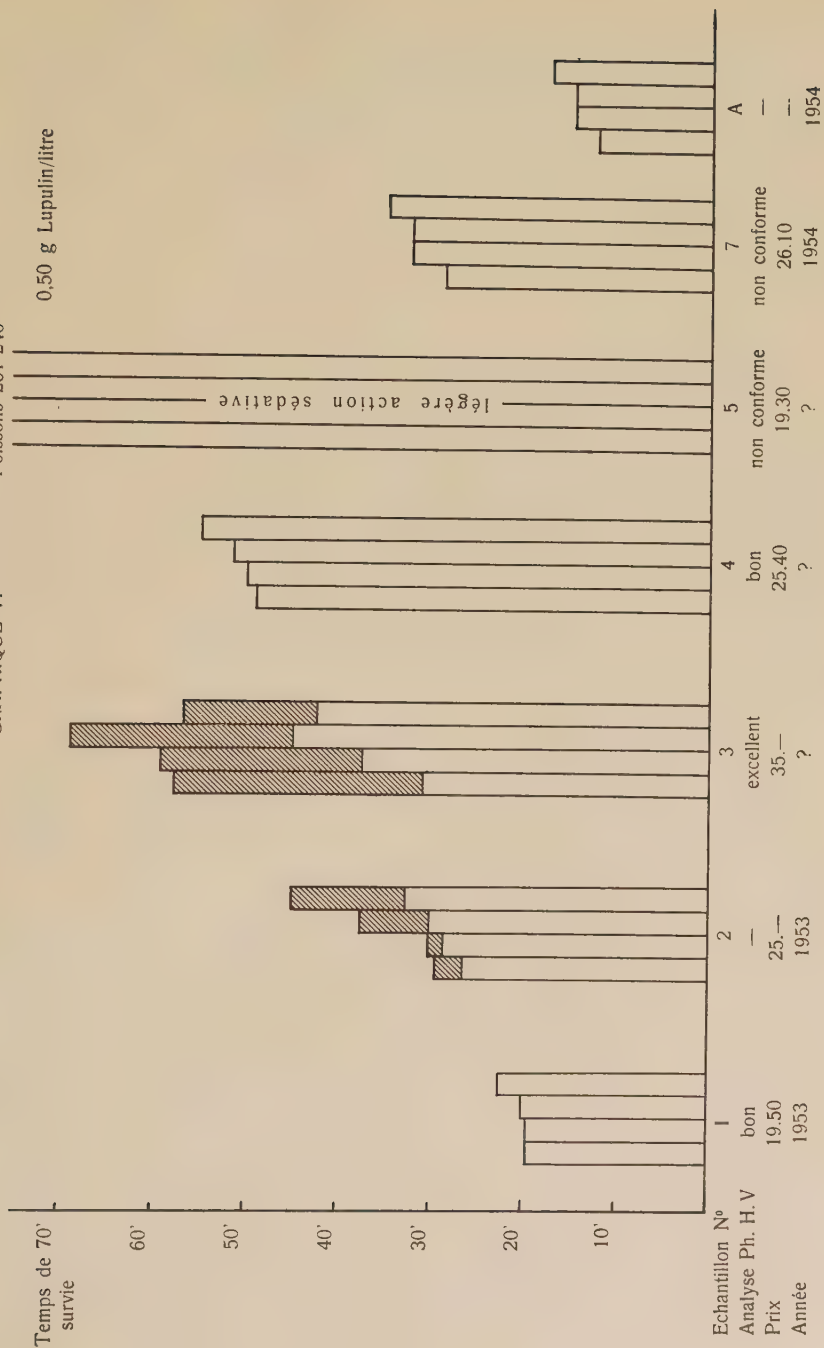
0,25 g Lupulin/L



GRAPHIQUE VI

Poissons 201-240

0,50 g Lupulin/litre



Echantillon n° 2 (1953)

Les premiers résultats des essais, indiqués en hachures sur le graphique V, montraient de grandes variations dans les temps de survie des poissons. Ces derniers ayant été utilisés dès leur arrivée au laboratoire, l'essai a été répété avec des poissons acclimatés au moins pendant 36 heures. Les nouveaux résultats mentionnés en noir sont dans des limites acceptables (10 minutes environ).

L'échantillon n° 2 est moins actif que l'échantillon n° 1 de la même année.

Echantillons n°s 3 à 5

Les échantillons 3 à 5 proviennent du même fournisseur. L'année de production n'est pas connue.

Lors de l'essai de la décoction à 0,25 g. par litre, ces trois échantillons n'ont pas donné de résultats dans le laps de temps prévu, ce qui nous a obligé à répéter les expériences à la dose de 0,5 g/l.

Les valeurs du premier essai avec le n° 3 (en hachures sur le graphique) présentant de grandes différences, nous avons répété par deux fois nos essais, en ayant soin de refaire chaque fois la décoction. Les résultats obtenus montrent les mêmes variations. Ce fait n'a pas été observé pour d'autres lupulins, pas même pour le n° 4 qui provient du même fournisseur, et qui présente sensiblement le même temps de survie pour les poissons.

L'échantillon n° 5, à la dose de 0,5 g. de lupulin par litre de décoction, ne montre qu'une légère action sédative sans mort du poisson après 120 minutes d'expérience.

On peut dire pour conclure que l'échantillon n° 3 est d'une qualité spéciale, peu active par rapport aux échantillons de 1953 et de 1954.

Le n° 4 est de la même activité et le n° 5 est très peu actif. Si ces lupulins sont de 1954, il est possible qu'ils aient été séchés à une température beaucoup trop haute, ce qui équivaut à une altération.

Echantillons n°s 7 et A

Le lupulin n° 7 de 1954 présente une activité analogue à celle du n° 2 de 1953, tandis que le n° A possède sur le cyprin l'action pharmacologique la plus efficace. Le test du n° 7 a été répété pour vérifier la reproductivité des essais. Des différences de 5 minutes au maximum ont été constatées.

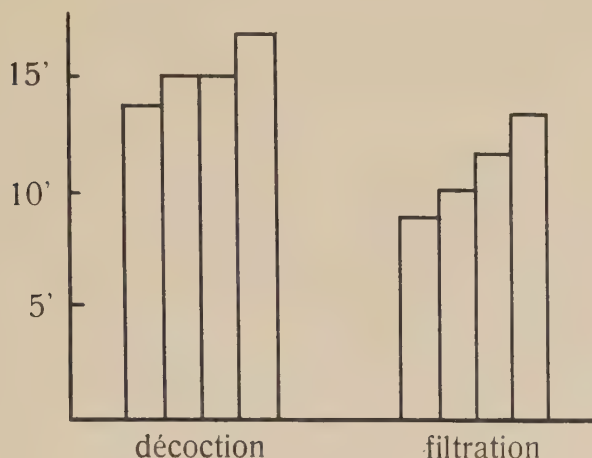
Dans l'expérience suivante, nous nous proposons d'examiner quelle quantité d'eau il serait nécessaire d'utiliser pour épuiser complètement, par le procédé de la décoction, les principes actifs d'un lupulin 1954 responsable de l'effet pharmacologique observé sur le cyprin doré.

8. Détermination de la solubilité du lupulin dans l'eau bouillante

Nous avons observé lors de la préparation des décoctions qu'une partie du lupulin adhère aux parois du récipient, rendant l'extraction incomplète. C'est particulièrement le cas avec les lupulins frais, contenant une

grande partie de résines molles. Pour observer si de meilleurs résultats pouvaient être obtenus par extractions sur filtre, nous avons procédé à un essai avec un filtre de verre G3 et le lupulin 1954 n° A.

Le filtrat obtenu a été testé sur le poisson, les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :



Ces résultats montrent que l'extraction sur filtre permet un épuisement plus complet que la méthode de la décoction. Ceci n'infirme d'ailleurs en rien les valeurs obtenues par cette dernière méthode, qui ne sont que comparatives, mais cette observation doit être prise en considération lorsqu'il s'agit de déterminer la solubilité, car elle représente une amélioration dans cette détermination.

a) *Méthode utilisée pour la détermination de la solubilité du lupulin dans l'eau bouillante*

La quantité de lupulin entrant en ligne de compte est exactement pesée et placée sur un filtre en verre fritté, qualité Iéna 1 G3. Le tout est placé sur un erlenmeyer à vide et relié à l'aide d'un « by-pass » à la trompe à eau.

La quantité d'eau utilisée est mesurée, portée à ébullition et maintenue à cette température pendant la filtration.

Il est important, lors de la filtration, de maintenir le lupulin constamment recouvert d'eau, pour éviter l'oxydation des résines amères chaudes.

Après la filtration, le creuset filtrant est séché à 105° C pendant 1 et 2 heures et la perte de poids est déterminée.

Pour nos essais, nous avons utilisé le lupulin A de 1954 et nous avons obtenu les résultats suivants pour 0,5000 g. de lupulin :

<i>Extraction avec</i>	<i>Perte en poids</i>	<i>Perte en %</i>
1 litre	79 mg.	15,8
2 litres	143 mg.	28,7
3 litres	156 mg.	31,2

Avec la même quantité de lupulin, mais avec un filtre plus fin, donc à débit plus lent, les valeurs suivantes ont été observées :

1,5 litre	180,5 mg.	36,1
---------------------	-----------	------

La perte au séchage à 105° C du lupulin non traité a été déterminée :

Pour 1 heure . . .	3,66 %
Pour 2 heures . . .	4,74 %
Pour 3 heures . . .	5,48 %

D'autre part, le séchage sur acide sulfurique concentré a donné une perte de 0,76 %.

Lors du séchage à 105° C, le lupulin perd donc une certaine quantité de produits volatils, dont une partie au moins peuvent être solubles.

Pour obtenir une extraction plus complète, nous avons cru utile de faire des essais en diminuant la quantité de lupulin mise en œuvre à 0,1000 g.

Les résultats avec 0,1 g. de lupulin A 1954 ont été les suivants :

1 litre	21,7 mg.	21,7
2 litres	26,9 mg.	26,9
3 litres	27,1 mg.	27,1

Nous remarquons que le poids après une heure de séchage à 105° C n'a plus diminué comme c'était le cas pour la série à 0,5 g.

Dans ce dernier essai, il n'a pas été possible d'extraire jusqu'à 36 % comme ci-dessus. Il semble donc que par ce procédé de filtration il ne soit pas possible d'épuiser le lupulin, partant de déterminer la quantité de matières à extraire.

D. DISCUSSION GÉNÉRALE

Que ceux qui voudront bien se reporter au présent travail ne soient point surpris du choix de *Carassius auratus* comme animal d'expérience.

Fauconnet ⁸² a, en 1946, dans une thèse remarquable, mis au point une méthode pharmacologique pour l'appréciation de l'action de la racine fraîche de Valériane sur le cyprin doré, tandis qu'en 1950 Bouchardy ⁸³ l'utilisait pour juger de l'activité physiologique de l'essence et des alcaloïdes de la racine sèche de Valériane. En 1953, Bouchardy ⁸⁴ publiait également une étude, étayée sur nos propres expériences ⁸⁵, dont les premières remontent à 1951, où elle décrivait l'action du lupulin et de la fleur

d'oranger sur le poisson. Elle écrivait alors : « L'étude pharmacologique de drogues douées d'action sédatrice est extrêmement délicate ; dans la littérature, de nombreux tests sur divers animaux ont été proposés. Parmi tous ces tests, celui imaginé par Fauconnet sur le poisson rouge est simple et, appliqué à l'étude de la valériane, permet une appréciation exacte de la valeur de cette drogue et donne des résultats reproductibles. »

C'est compte tenu de la simplicité de cette méthode et de la reproductibilité des résultats obtenus lors de l'étude de l'activité physiologique de la valériane que nous nous sommes préoccupés dès 1951 de contrôler si ce test convenait à d'autres drogues comme le lupulin*, que l'on trouve souvent prescrit en association avec la valériane en raison même de leur réputation commune de sédatifs.

Après Fauconnet, précisons que nous mesurons combien le cyprin doré est phylogénétiquement éloigné de l'homme et que nous sommes conscients que les conclusions tirées de nos observations et de nos expériences concernent uniquement le cyprin doré. Reprenant les propres termes de Fauconnet, le poisson auquel nous avons recouru a servi avant tout de « réactif », pour « révéler dans une fraction donnée la présence ou l'absence d'une substance pourvue d'une action physiologique déterminée, et permettre éventuellement une appréciation quantitative. Une fois la substance isolée et connue, son étude pharmacologique et clinique permettra de décider si elle peut être utilisée en thérapeutique humaine. »

Au début de nos expériences, nous nous heurtâmes à la difficulté d'interpréter les résultats fort divergents obtenus lors du comptage des mouvements par minute des opercules du poisson rouge : le rythme respiratoire de *Carassius Auratus* était fort irrégulier.

Après avoir éliminé l'éventualité de la présence dans le lupulin de principes ichtyotoxiques, nous avons entrepris de vérifier systématiquement la valeur du rythme respiratoire du cyprin doré en tant que test capable de nous renseigner sur l'action sédatrice d'une drogue. Pour ce faire, l'observation détaillée du comportement normal de *Carassius Auratus* était indispensable. A notre connaissance, elle n'avait pas été entreprise par Fauconnet et Bouchardy. Nous avons ainsi pu nous rendre compte que le rythme respiratoire de *Carassius Auratus* est sujet à de notables écarts difficiles à interpréter, car des changements dans les conditions de vie normale n'ont que peu ou pas d'influence sur ce rythme. Par conséquent, il y a lieu de faire les plus grandes réserves quant à la valeur à attribuer aux variations du rythme respiratoire du cyprin doré au cours d'une étude pharmacologique. Tout au plus pourrait-on noter sur plusieurs poissons en expérience une régularisation dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution du rythme, provoquée par une préparation en essai.

* La valeur de cette méthode a également été confirmée par un travail récent : « L'influence de quelques essences sur le système nerveux central des poissons » par B. Wesley-Hudzija et P. Bohinc. Annales pharmaceutiques françaises, N° 4, avril 1956, tome XIV, pp 283-289.

Nous n'avons cependant pas jugé utile de supprimer l'observation du rythme respiratoire au cours de nos expériences, afin de disposer de ces données pour d'éventuelles comparaisons ultérieures. Par contre, les autres tests utilisés par Fauconnet et Bouchardy sont parfaitement reproductibles. Ils nous ont permis d'étudier convenablement l'action des différentes préparations de lupulin sur le cyprin doré. La majorité des préparations de lupulin étudiées au cours de ce travail résultent d'extraction à froid par des solvants organiques. Ces derniers furent ensuite soigneusement éliminés de façon à n'utiliser sur le poisson rouge que des préparations alcooliques ou aqueuses.

C'est la raison pour laquelle nous avons vérifié dès le début de nos essais l'action de l'alcool éthylique administré aux poissons rouges à des concentrations identiques à celles des préparations de lupulin utilisées lors de nos expériences.

Nous pûmes ainsi nous convaincre de l'inactivité et de l'inocuité de l'éthanol sur le cyprin doré dans les conditions de nos expériences.

L'action physiologique des diverses préparations de lupulin appliquées au cyprin doré était donc bien l'image de l'activité des principes actifs du lupulin.

Les extractions ont été pratiquées à froid pour ménager des substances qui passent à juste titre pour thermolabiles et facilement oxydables.

Le choix des solvants a été dicté d'une part par les données de la littérature et de l'expérience sur la solubilisation des substances isolées du houblon et du lupulin et considérées comme spécifiques de cette plante, d'autre part par le souci de recourir aux solvants organiques les plus vraisemblablement capables d'extraire de la drogue un échantillon moyen des substances actives ou inactives, toxiques ou non, spécifiques de la plante étudiée. C'est ainsi qu'après l'eau, nous employâmes pour nos macérations à froid l'éthanol à diverses concentrations, l'acétone, l'éther de pétrole et l'alcool méthylique. Grâce à ces extractions, nous observâmes que le lupulin exerçait généralement sur *Carassius Auratus* une action successivement sédative et toxique.

Bien que l'on pût songer que la dose de lupulin administrée à chaque poisson en expérience, par dilution dans l'eau ambiante, ne fut pas résorbée immédiatement dans sa totalité, de sorte que la résorption d'une première fraction entraînait, jusqu'à un certain seuil limite, des effets sédatifs puis, au-delà, des effets toxiques, il était néanmoins admissible de concevoir que, compte tenu de la faiblesse des doses administrées aux poissons, nous étions en présence de substances différentes, les unes sédatives, les autres toxiques, dont la résorption était plus ou moins rapide selon leur nature ou selon les quantités en présence dans l'extrait de lupulin.

Cette seconde hypothèse se montra la bonne, puisque l'humulone et la lupulone essayées isolément, à l'état pur, sur le cyprin doré, révélaient en solutions aqueuses, très vite saturées, étant donné la faible hydrosolubilité de ces deux substances, pour l'humulone une action nulle, pour la lupulone une action toxique et non sédative. L'absence d'activité de l'humulone peut

être rapportée dans les conditions de nos expériences à sa très faible solubilité dans l'eau, environ trois fois inférieure à celle de la lupulone.

La dose de lupulone administrée à chaque cyprin (250 ml. d'eau à 0,1 ‰ p/v de lupulone, soit 25 mg. de lupulone) s'est révélée rapidement mortelle en moins d'un quart d'heure ; en diminuant la dose de moitié, le cyprin survit environ 40 minutes sans pouvoir déceler d'action sédatrice ; en prenant le quart de la dose première, soit 6,25 mg. il n'y a plus aucun effet quelconque sur le poisson rouge.

La faible hydrosolubilité de la lupulone est cependant suffisante pour prouver la toxicité de cette substance et montrer que l'action sédatrice observée sur le cyprin doré ne peut lui être attribuée. Il aurait été intéressant de préparer l'humulate de sodium et le lupulinate de sodium, tous deux très solubles dans l'eau. Malheureusement, nous ne disposons pas de quantités suffisantes de ces deux substances à l'état pur. Nous pouvons cependant prévoir que le lupulinate de sodium est vraisemblablement très toxique pour le cyprin doré et non sédatif, en nous rapportant aux expériences avec la lupulone pure. Quant à l'humulate de sodium, étant donné que nous n'avons rien observé avec des doses d'humulone pure, environ trois fois inférieures aux doses de lupulone administrées, il nous est difficile de nous prononcer. L'humulate de sodium permettrait d'administrer l'humulone à doses élevées et d'observer son activité sur le poisson.

Des essais pour séparer les principes sédatifs des principes toxiques du lupulin en traitant à nouveau par un solvant de même nature ou par un solvant non encore utilisé, pentane ou benzène, des lupulins déjà épuisés une première fois, n'ont pas abouti.

L'extraction à froid des principes sédatifs seuls du lupulin n'était pas réalisable, c'est la raison pour laquelle une méthode d'extraction à chaud nous parut s'imposer. Pour ce faire, nous avons procédé par déduction en raisonnant sur le mode de préparation de la bière, où les cônes de houblon jouent, comme on le sait, un rôle important non par les quantités utilisées (en moyenne suivant les bières de 200 à 750 g. par hectolitre de moût) mais par les qualités qu'ils confèrent à cette boisson.

Il est important pour la suite de notre discussion de relever que la bière crée chez les consommateurs une tendance à l'assoupissement⁸⁶, c'est-à-dire qu'elle favorise l'apparition de l'état d'engourdissement qui précède le sommeil. Si l'on a pu dire que les « fumées » du vin assoupissent grâce à sa teneur en alcool, il est difficile d'admettre que la bière, qui titre en moyenne 3 à 5 % d'alcool, exerce le même effet pour le même motif. Bien au contraire, on sait que, d'une manière générale, l'alcool stimule à faibles doses. La difficulté d'assimilation de la bière par le système digestif ne peut non plus être invoquée comme facteur d'assoupissement, car la bière de qualité est considérée comme une boisson légère, nourrissante, désaltérante, tolérée même par les estomacs délicats.

Le rôle de l'alcool de la bière et celui de la digestion de cette boisson sont à éliminer pour les raisons ci-dessus exposées, et parce que nous savons que les infusions de cônes de houblon et le lupulin sont utilisés comme ana-

phrodisiaques, notamment dans les pénitenciers, pour calmer l'éréthisme génital en rapport ou non avec une affection de la muqueuse génito-urinaire⁸⁷.

On a d'autre part remarqué que les cueilleuses de houblon éprouvent de l'engourdissement pendant la récolte des cônes et que les ouvriers des houblonnières présentent une ophtalmie qui leur est propre, dont on attribue l'origine au houblon irritant pour les muqueuses.

Ces deux observations sont importantes, car elles permettent de formuler l'hypothèse que seuls des principes volatils peuvent être responsables de la tendance au sommeil des cueilleuses de houblon et de l'irritation des muqueuses oculaires des ouvriers de houblonnières.

Quatre observations doivent être rapprochées :

1. La cueillette du houblon engourdit ;
2. la bière houblonnée assoupit ;
3. l'infusion de houblon est sédative anaphrodisiaque ;
4. le lupulin administré pur en cachets est calmant et anaphrodisiaque.

Seules des substances volatiles peuvent être à l'origine de l'observation 1. Quant à l'observation 2, une fois écartée la possibilité d'une influence de l'alcool présent dans la bière, on notera que le houblonnage du moût (ou solution aqueuse d'extrait de malt) se pratique à *chaud*, c'est-à-dire dans des conditions où les principes volatils du houblon sont partiellement entraînés, mais aussi partiellement solubilisés.

Il en est de même lorsqu'on prépare une infusion de cônes de houblon.

L'administration de lupulin comme sédatif prend toute sa valeur si l'on admet que l'essence de lupulin est l'élément principal de cette drogue, qui peut en contenir 1 à 2 %. Or, l'essence de lupulin, comme toutes les huiles essentielles, est volatile, c'est pourquoi elle est très odorante. Neutre, légère (0,880 à 0,885), bouillant selon notre expérience à 153° C, elle est entraînable par la vapeur d'eau.

En mettant en évidence ce que ces quatre observations ont de commun :

un solvant : l'eau ;

un principe volatil : l'huile essentielle de lupulin,

nous avons été logiquement conduit à préparer de l'essence et de l'eau distillée de lupulin pour en vérifier l'activité sur *Carassius auratus*.

Nous avons ainsi pu prouver que l'huile essentielle de lupulin et l'eau distillée de lupulin (par l'essence qu'elle renfermait en solution) possédaient sur le cyprin doré une action sédative exempte de manifestations toxiques. En montrant que le lupulin, débarrassé de son essence, perdait son activité sédative, mais présentait une nette toxicité, nous avons trouvé le moyen de séparer par entraînement à la vapeur d'eau les principes sédatifs du lupulin de ses principes toxiques.

Dans la conclusion de la page 61, nous avons émis l'hypothèse que la toxicité du lupulin semblait due à un principe non volatil et thermostable. Que le ou les principes toxiques du lupulin soient non volatils nous paraît évident après nos expériences. Par contre, leur thermostabilité mérite qu'on s'y attarde.

Nous avons vu qu'après trois heures de chauffage à la température d'ébullition, l'extrait alcoolique du lupulin, débarrassé de son essence, n'avait rien perdu de la toxicité que nous avons déjà observée lors de nos expériences avec les préparations de lupulin provenant d'extractions à froid. La cause des manifestations toxiques observées alors sur le cyprin doré doit être attribuée, comme nous l'avons vu, à la lupulone et peut-être à l'humulone, dont la faible hydrosolubilité ne nous a pas permis de rechercher l'activité des doses équivalentes à celles de lupulone. Or, nous savons, notamment par les remarquables travaux de Govaert et Verzele ⁸⁸, que l'humulone et la lupulone sont thermolabiles et très facilement oxydables. En outre, comme nous l'avons déjà mentionné, ces auteurs ont prouvé que l'humulone entraine en solution dans le moût de bière sous une forme isomère : l'isohumulone, bien plus soluble et plus amère que l'humulone et surtout thermostable. Il est donc permis de supposer que la toxicité observée avec les préparations de lupulin, privé de son essence par entraînement à la vapeur d'eau sous ébullition prolongée, est due en grande partie à l'isohumulone et que vraisemblablement l'humulone, étant donné son isomérisation (dont la nature n'est pas encore déterminée) avec l'isohumulone, exerce à fortes doses une action toxique sur le cyprin doré, analogue à celle de la lupulone.

Au cours de nos expériences, nous avons montré que le vieillissement de l'eau distillée de lupulin entraîne une diminution de l'action sédative, accompagnée d'une augmentation de la toxicité.

Cette observation confirme celles de nombreux auteurs ayant signalé que la composition de l'huile essentielle de lupulin se modifie avec le temps, de sorte que l'essence se trouvant dans les glandes de lupulin se transforme graduellement. Le valérol qui contient l'essence de houblon se transforme en acide valérianique par vieillissement, d'où l'odeur désagréable des vieux lupulins.

Cette dernière remarque nous a induit à chercher s'il existait une relation entre l'action pharmacologique du lupulin sur le cyprin doré et son âge de conservation. Elle nous semble exister après avoir trouvé une proportionnalité entre la survie du poisson et l'âge du lupulin.

L'emploi de « décoctions » se justifie par la rapidité de la méthode. Il faut cependant considérer que par ce procédé on évalue essentiellement la toxicité du lupulin. Dans nos conditions d'expérience, cette toxicité diminue, tandis qu'augmente l'âge du lupulin, parce que la lupulone et l'humulone se transforment à mesure du vieillissement de plus en plus en résines pratiquement insolubles dans l'eau chaude ou froide.

Cette remarque n'est pas en contradiction avec l'observation de l'augmentation de la toxicité par vieillissement des eaux distillées de lupulin, parce que lors de la préparation des « décoctions » il y a très peu d'essence solubilisée et parce que les produits de transformation formés à partir de l'essence, lors du vieillissement des eaux distillées de lupulin, sont solubles dans l'eau, et ils sont vraisemblablement différents des produits de transformation de l'humulone et de la lupulone.

E. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de recherches sur l'appréciation pharmacologique du lupulin, nous avons recouru à la méthode utilisée par Fauconnet ⁸⁹ pour l'appréciation pharmacologique de la valériane. Cette méthode emploie le cyprin doré (*Carassius auratus*) comme animal d'expérience et consiste à observer selon des critères choisis raisonnablement le comportement de plusieurs cyprins et d'un poisson témoin, lorsqu'on ajoute à l'eau du récipient, dans lequel chacun d'eux se trouve, une préparation de lupulin.

Des essais préliminaires consistant en une série de macérations de lupulin récolté en 1948 dans divers solvants, à la concentration de 20 %, ont révélé que :

1. les macérations aqueuses de lupulin étaient sans action sur le cyprin doré ;
2. les macérations dans les solvants organiques usuels après filtration, évaporation sous pression réduite et solubilisation de l'extrait ferme obtenu par l'alcool pur ou dilué, exerçaient sur le cyprin doré une action sédative accompagnée de manifestations toxiques (spasmes) aboutissant généralement à une mort rapide (quelques minutes) de l'animal d'expérience.

Ces essais nous permirent de conclure que :

1. l'eau était un mauvais solvant des principes actifs du lupulin ;
2. les macérations dans des solvants organiques reprises ensuite par l'alcool pur ou dilué présentaient une double action sédative et toxique.

Sur la base des conclusions tirées des observations précédentes, nous avons cherché à séparer l'action toxique de l'action sédative du lupulin, en vérifiant si un lupulin traité par un solvant ayant extrait des principes actifs toxiques contenait encore des substances actives extractibles par d'autres solvants. Nos essais furent vains, toutes les préparations obtenues se montrant toxiques et fort peu sédatives.

Connaissant les principaux composants du lupulin (humulone, lupulone, essence de lupulin) et leur solubilité, il était évident que ces principes se trouvaient dans toutes ou plusieurs des extractions précédentes, et que les principes responsables de l'action sédative du lupulin sur le cyprin devaient être recherchés en procédant à une discrimination plus complète des éléments constitutifs du lupulin.

L'humulone, la lupulone et l'essence de lupulin furent successivement étudiés.

Action de l'humulone

L'humulone étant très peu soluble dans l'eau, nous avons préparé une solution aqueuse saturée d'humulone, dont la concentration était inférieure à 0,1 g/l.

L'action pharmacologique d'une telle solution sur le cyprin doré est nulle.

Action de la lupulone

Une solution aqueuse de lupulone à 0,1 ‰ exerce sur le cyprin doré une forte action toxique. Il en est de même pour une solution à 0,05 ‰. Une solution à 0,025 ‰ n'exerce après 60 minutes ni action toxique ni action sédatrice.

Conclusions

L'action sédatrice du lupulin ne peut être imputée à la lupulone.

Quant à l'humulone en solution aqueuse saturée, elle n'exerce aucune action pharmacologique sur le cyprin doré.

Action de l'essence de lupulin

L'essence de lupulin a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

Les observations ont été complétées par l'étude de :

1. l'action de l'eau distillée de lupulin ;
2. l'action d'une extraction alcoolique de lupulin privé de son essence par entraînement à la vapeur d'eau ;
3. l'action des eaux-mères dans lesquelles le lupulin a macéré durant l'entraînement à la vapeur d'eau.

Nous résumons ci-après les résultats obtenus :

- a) l'essence de lupulin a une action sédatrice marquée ;
- b) l'eau distillée de lupulin, probablement à cause de l'essence qu'elle contient, est aussi fortement sédatrice ;
- c) l'action de l'essence et de l'eau distillée de lupulin sur le cyprin est dépourvue de manifestations de toxicité aux doses sédatrices ;
- d) le lupulin débarrassé de son essence perd son activité sédatrice mais conserve intégralement sa toxicité sur le cyprin doré ;
- e) de par le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau qui fut employé, il est aisé de déduire que la toxicité du lupulin est due à un principe non volatil, et que tout se passe comme si les principes toxiques étaient thermostables.

Influence du temps sur les préparations sédatrices de lupulin

Après les observations précédentes, nous avons cherché à connaître quelle pouvait être l'influence du temps sur les propriétés sédatrices des eaux distillées de lupulin.

Nous avons choisi des eaux distillées de lupulin préparées en mai 1952 et conservées à l'obscurité sans précautions spéciales dans des flacons convenablement bouchés. Ces mêmes préparations ont été essayées sur le poisson en octobre 1954, soit plus de deux ans après leur fabrication.

Nous avons constaté une action sédative mais également toxique, car les poissons d'expérience, remis dans une eau fraîche dès qu'ils ont la même apparence de narcose que lorsqu'on utilise une teinture de valériane de référence, ne reviennent pas à la vie contrairement à ce qui a toujours été observé avec l'eau distillée et l'essence fraîche de lupulin.

Conclusions

L'eau distillée de lupulin se révèle sédative à l'état frais sur le cyprin doré (des contrôles nous ont permis de constater que cette vertu se conservait pendant quelques mois), mais après 24 mois de stockage l'action sédative s'accompagne de manifestations toxiques, dues probablement à des modifications des principes actifs au cours du vieillissement de la préparation.

Après avoir vérifié que l'essence fraîche non résinifiée et l'eau distillée fraîche de lupulin, cette dernière par l'essence qu'elle contient, sont responsables de l'action sédative du lupulin sur le cyprin doré, nous avons cherché à établir s'il existait une relation entre l'action sédative du lupulin sur le poisson et son âge de conservation.

La méthode d'entraînement de l'essence par la vapeur d'eau nous parut encombrante et longue pour un test rapide au laboratoire.

Nous nous sommes alors souvenus d'une préparation bien connue, réputée sédative, dans la fabrication de laquelle le houblon joue un rôle important : *la bière*.

Lors de la fabrication de la bière, le houblon est traité par ébullition avec l'extrait de malt et outre certaines qualités organoleptiques lui confère, dit-on, des vertus sédatives.

Nous avons procédé à des « décoctions » de lupulin.

Une première décoction de 10 g. de lupulin 1948 par litre d'eau nous révéla que l'activité spontanée des poissons, toujours selon la méthode utilisée par Fauconnet, était presque nulle après 13 minutes, mais que quelques spasmes considérés comme des manifestations de toxicité apparaissaient à ce moment. Les poissons replacés dans l'eau fraîche mouraient.

Pensant alors que la décoction à 10 ‰ de lupulin était trop forte, nous l'avons diluée en prenant :

200 ml. de la même solution à 10 ‰

qui furent complétés au litre avec de l'eau. Le résultat de l'essai sur le cyprin fut nul.

On pouvait ainsi résumer cette première observation en constatant :

1. qu'une décoction de lupulin à 10 ‰ exerce un effet sédatif marqué sur le cyprin, mais que cet effet est suivi de spasmes qui entraînent la mort ;
2. que la même décoction diluée cinq fois comme si elle avait été préparée directement à 2 ‰ n'a pas d'effet sur le poisson.

Par souci de vérification, nous préparâmes alors une décoction de lupulin à 2 ‰ et nous observâmes que sur les quatre poissons testés deux mouraient en 13 minutes, un autre en 20 minutes, tandis que le dernier survivait encore au bout de 23 minutes après lesquelles nous le remplaçâmes dans l'eau fraîche avant l'apparition des spasmes prémonitoires de l'exit.

Intéressés par cette observation, dans les mêmes conditions que nous avions procédé pour la décoction à 10 ‰, nous diluâmes la décoction à 2 ‰, mais seulement deux fois au lieu de cinq (500 ml. de décoction à 2 ‰ + 500 ml. d'eau). L'essai sur le poisson fut à nouveau nul.

Dans ces circonstances nous fîmes une décoction de lupulin à 1 ‰, pour essayer d'obtenir une action sédative permettant au poisson de subir intégralement le test habituel dont la durée fut toujours limitée à 60 minutes.

Les essais montrèrent qu'une décoction à 1 ‰ de ce lupulin 1948 exerce une action sédative sur le poisson avec un temps de survie de 50 à 60 minutes.

En résumé, l'application d'une dilution de décoction à 10 ‰ et d'une dilution à 2 ‰ de lupulin de la même décoction sur le cyprin doré ne permet pas d'observer d'effet pharmacologique.

Par contre, la préparation directe d'une décoction à 2 ‰ de lupulin permet de constater sur le cyprin doré un effet sédatif analogue à celui obtenu avec une décoction à 10 ‰ de lupulin.

Cela signifie que les principes sédatifs du lupulin sont très peu solubles dans l'eau et qu'en préparant une décoction à 2 ‰ de lupulin, on dépasse la limite de saturation de l'eau en principes actifs.

Avec une décoction à 1 ‰ nous sommes à la limite de saturation de l'eau en principes actifs.

Nous avons ainsi limité la concentration qui nous permettrait de faire des essais comparatifs utiles entre des décoctions à 1 ‰ de lupulins d'âge différent.

Pour avoir des valeurs comparables et reproductibles, nous avons choisi comme terme de l'expérimentation sur le cyprin, non pas l'apparition de la narcose qui peut donner lieu à des interprétations, mais la mort du poisson.

La mort est facile à observer, car elle est précédée de spasmes violents pendant 1 à 3 minutes. Ces spasmes résultent du procédé de « décoction » qui ne permet pas de séparer les principes toxiques et sédatifs.

Nous avons utilisé pour nos essais les lupulins suivants :

1. Lupulin 1948
2. Lupulin 1949
3. Lupulin 1951
4. Lupulin 1952
5. Lupulin 1953

Nous avons préparé avec chacune de ces drogues des décoctions à 1 ‰, que nous avons ensuite testées sur le cyprin doré.

Des valeurs obtenues il ressort une proportionnalité entre la survie du poisson et l'âge du lupulin.

Nous pensons que cette série d'observations nous a mis sur la voie, par l'application de la décoction de lupulin au cyprin doré, d'une méthode d'appréciation pharmacologique pour le lupulin.

Ce test présente l'avantage d'être simple, rapide, économique et reproductible.

F. RÉSUMÉ

Au cours de recherches sur l'appréciation pharmacologique du lupulin, nous avons constaté que l'eau était un mauvais solvant des principes actifs du lupulin et que des macérations dans des solvants organiques, dont le résidu sec a été ensuite repris par l'alcool, présentaient une double action sédative et toxique sur le cyprin doré. Nous avons observé que l'action sédative du lupulin ne peut être imputée ni à la lupulone ni à l'humulone. En extrayant l'essence de lupulin par entraînement à la vapeur d'eau, nous pûmes séparer l'action toxique de l'action sédative et nous trouvâmes que l'essence de lupulin et l'eau distillée de lupulin ont une action sédative marquée sur le cyprin doré. La toxicité du lupulin sur le cyprin doré est due à un principe non volatil. L'étude d'eaux distillées de lupulins de différents âges révéla que l'eau distillée de lupulin exerce une action sédative sur le cyprin doré seulement pendant les premiers mois suivant sa préparation et qu'une eau distillée conservée par exemple pendant 24 mois exerce à la fois une action sédative et toxique. Nous avons tenté d'établir une relation entre l'action sédative du lupulin sur le poisson et son âge de conservation. L'application de décoctions de lupulin au cyprin doré nous a permis de jeter les bases d'une méthode d'appréciation pharmacologique pour le lupulin. Cette méthode présente l'avantage d'être simple, rapide, économique et reproductible.

G. BIBLIOGRAPHIE

1. D. MICHENER, N. SNELL, E. F. JANSE : *Archives of Biochemistry*, vol. 19 (1948), p. 199.
2. J. C. LEWIS, G. ALDERTON, G. F. BAILEY, J. F. CARSON, D. M. REYNOLDS, F. STITT : Antibacterial agents from hops. Western Regional Research Laboratory, Albany 6, Calif., U.S.A., Circular AIC-231, April 1949.
3. H. RISCHÉ et K. ROHNE : Bakteriostatische Stoffe aus Hopfen. *Das Deutsche Gesundheitswesen*, Heft 47 (1950), p. 1484.
4. W. F. ERDMANN : Lupulon und Humulon, ihre antibakterielle Wirksamkeit und Anwendung bei tuberkulösen Injektionen. *Phytonzide I. Pharmacie 6*, 9 : 442-451 (1951) ; *Pharmacie 7*, 2 : 75-86 et 132 (1952).

5. H. SCHULZ : Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen 2. A. Leipzig, 1929.
6. GRÖNBERG : *Therapie der Gegenwart*, 1927, 68, 389.
7. cité par OTTO EIFLER : Schrifttum ueber die physiologischen Wirkungen des Hopfens aus Ges. f. d. Gesch. und Bibliographie des Brauwesens e.v. Berlin, 1940. Institut fuer Gärungsgewerk.
8. STEIDLE : *Arch. exp. Path. Pharm.* 161, 154, 1931.
9. SIKORSKI et RUSIECKI : *Bull. intern. Acad. Pol. sc. et méd.* 1936, p. 73. Über die sedativ wirkenden Stoffe des Hopfens.
10. ANNE STAVEN-GRÖNBERG : *Acta Soc. Medic. Fennicae* 1929, Bd. XI ; *Archiv. exp. Path. Pharm.* 123, 272, 1927.
11. NEUMANN : *Wien. med. W'schr.* 83, 571, 1933.
12. cité par O. EIFLER.
13. *loc. cit.*
14. TSCHIRSCH. Handbuch der Pharmakognosie-Verlag von Tauchnitz. Leipzig 1925.
15. *loc. cit.*
16. K. KAHNT : Die Phytotherapie. Berlin, 1906.
17. cité par O. EIFLER.
18. *loc. cit.*
19. *loc. cit.*
20. E. POULSSON : Lehrbuch der Pharmakologie 15. A. 1947.
21. A. HAUSER et F. KULTER : Der Hopfenanbau in der Schweiz, Privatdruck der Bräuerei. A. Hürlimann AG., Zürich. April 1956.
22. citée par EMILE PERROT : La culture des plantes médicinales. Presses universitaires de France. 1947.
23. A. BLANK : *J. S. P.* 1952 : 730.
24. TSCHIRSCH : Spezielle Pharmakognosie III, 2, 828.
25. CHARLES VERMEULEN : Bekanntes und Unbekanntes vom Hopfen. *Die Brauwelt*, n° 18. ES. B. 1948, p. 377.
26. ZATTLER : *Pharma-Medico*, Heft 3, 2. Jahrg. ; *Zyma Journal*, 1^{re} année, n° 2, p. 29.
27. cités par O. EIFLER.
28. cités par O. EIFLER.
29. cités par O. EIFLER.
30. cités par O. EIFLER.
31. PLANCHE : *Journ. Pharm.* 8, 229 (1822).
32. C. A. HOFMANN. Ueber den Hopfen 1820, cité par TSCHIRSCH.
33. PAYEN et CHEVALIER : *Ann. chim. phys.* 20 (1822), 301.
34. PELLETAN : *Journ. chim. méd.* 2 (1826), 527.
35. IVES : *Am. J. of Science* (1820), p. 320.
36. *loc. cit.*
37. *loc. cit.*
38. cité par O. EIFLER et STAVEN-GRÖNBERG.

39. cité par O. EIFLER et STAVEN-GRÖNBERG.
40. DRESER : Arch. exp. Path. 23, 129, 1897.
41. cité par O. EIFLER et STAVEN-GRÖNBERG.
42. loc. cit.
43. loc. cit.
44. FORST : Archiv. exp. Path. Pharm. 189, 288, 1938.
45. loc. cit.
46. WALKER et PARKER : Journ. Inst. Brew. 1937, 43 : 17-30.
47. loc. cit.
48. loc. cit.
49. loc. cit.
50. loc. cit.
51. M. VERZELE et F. GOVAERT : Congrès International des Industries de Fermentation, Gand, 1947, Conférences et Communications, p. 297.
52. Ullmann's Enzyklopaedie der Technischen Chemie, 3. Supl. Bd. 4, p. 345.
53. Kommentar zur Pharmacopoea Helvetica V, p. 535 et 715.
54. H. WIELAND : Ber. (1925), p. 102 et 2012 ; (1926), p. 2352.
55. W. WÖLLMER : Ber. (1898), p. 2023 ; (1916), p. 780.
56. Encyclopedia of Chemical Technology, volume 2, p. 385.
57. ZÄTTLER : Deutsche Brauwirt. 52, 43 (1944).
58. Ullmann's Enzyklopaedie der Technischen Chemie, 3. Supl. Bd. 4, p. 345.
59. J. STOCKX : Mededeel. Vlaam. Chem. Ver. 8, 132-143 (1946).
60. LERMER : cité par O. Eifler et J. Stockx.
61. A. GUILLAUME et E. LANG : France Pharmacie 1953, n° 1.
62. A. C. CHAPMAN : J. Inst. Brew. 31, 13 (1925).
63. SEMMLER : Ber. d. chem. Ges. 2009, 1911.
64. WASICKY : Physiopharmakognosie, p. 568-569.
65. loc. cit.
66. FREUDENBERG : cité par J. Stockx.
67. HAYDUCK : Wochenschrift f. Brauerei (1885) p. 267, (1887) p. 397, (1888) p. 937.
68. Y. C. CHIN, H. H. ANDERSON : Toxicology and pharmacology of lupulon. Archiv. Int. Pharmacodyn. 82 (1950), 1.
69. GRIESSMAYER : Allgem. Brauer- und Hopfenzeit. 1892.
70. POWER, TUTIN et ROGERSON : The constituents of hops. J. Chem. Soc. London, 1913 (2), p. 1267.
71. BEYAERT et CORNAND : L'extraction des acides α et β du houblon ou de la lupuline. Congrès international des Industries de Fermentation. Conférences et Communications. Gand, p. 236-278 (1947).
72. ibidem.
73. GOVAERT et VERZELE : Détermination quantitative des acides α et β dans le houblon. Congrès International des Industries de Fermentation. Conférences et Communications, p. 231-234 (1947), et sur la transformation de l'humulone, ibidem, p. 297-301.

74. A. GUILLAUME et E. LANG : *France Pharmacie*, n° 2, février 1953.
75. FAUCONNET : Thèse, *Mém. Soc. Vaud. Sc. Nat.* 57, vol. 8, n° 7 (1946) et *Ph. Acta Helv.* 22, 265 (1947).
76. BOUCHARDY : *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 28, 198, 1953.
77. *loc. cit.*
78. *loc. cit.*
79. RIEDL : *Chem. Ber.* 85 : 1952, 692.
80. GOVAERT et VERZELE : *Bull. Soc. Chim. Belg.* 58 : 1949, 432.
81. AMWAR HAKIM : Thèse, Genève 1951. Contribution à l'étude d'incompatibilité de quelques teintures.
82. *loc. cit.*
83. BOUCHARDY : Contribution à l'étude de la racine sèche de valériane. Thèse, Genève, 1950.
84. *loc. cit.*
85. P. GRUMBACH et A. MIRIMANOFF : Remarques sur l'appréciation pharmacologique du lupulin. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, tome 94, n° spécial de 1955.
86. F. GRANDJEAN : *Schweiz. Med. W'schr.* 65, 1004 (1935).
87. L. PLANCHON, P. BRETIN, P. MONCEAU : Précis de matière médicale. 1946. Maloine-Paris, p. 434.
88. *loc. cit.* (p. 231-234). GOVAERT et VERZELE : *Fermentation*, nos 4/6, p. 35-42.
89. FAUCONNET : Contribution à l'étude de la racine fraîche de valériane. Thèse, Lausanne, 1946.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Introduction	7
1. <i>Description du houblon et du lupulin</i>	8
2. <i>Historique de l'emploi du houblon</i>	12
3. <i>Propriétés pharmacologiques</i>	14
4. <i>Rôle du houblon dans la préparation de la bière</i>	17
5. <i>Principes actifs</i>	18
a) <i>L'huile essentielle</i>	22
b) <i>Les tanins</i>	25
c) <i>Les substances amères</i>	26
d) <i>Alcaloïde</i>	27
e) <i>Recherche des principes actifs</i>	28
6. <i>Conclusion</i>	30

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE L'ACTION DU LUPULIN SUR LE CYPRIN DORÉ

1. <i>Introduction</i>	31
2. <i>Remarques préliminaires</i>	32
3. <i>Etude du comportement normal du cyprin doré</i>	32
a) <i>Les poissons et leur entretien</i>	32
b) <i>Observations sur le comportement normal des cyprins dorés</i>	33
c) <i>Conclusions</i>	37
4. <i>Action pharmacologique sur le cyprin doré de quelques substances réputées sédatives chez l'homme</i>	37
a) <i>Teintures de valériane</i>	37
b) <i>Phénobarbital sodique</i>	44
c) <i>Hydrate de chloral</i>	45
d) <i>Chloralose</i>	45
e) <i>Bromure de potassium</i>	46
f) <i>Conclusions</i>	46

5. <i>Etude de diverses extractions de lupulin</i>	47
a) Essais préliminaires	47
1. Tableau synoptique des préparations	48
2. Etude de leur action sur le cyprin doré	49
b) Conclusions des essais préliminaires	51
c) Essais de séparation de l'action sédative et de l'action toxique	51
1. Tableau synoptique des extraits préparés	52
2. Etude de leur action sur le cyprin doré	53
d) Conclusions des essais de séparation de l'action sédative et de l'action toxique	54
6. <i>Action pharmacologique des principaux composants du lupulin</i>	55
a) Humulone	55
1. Préparation de l'humulone à partir de l'humulate de plomb	55
2. Propriétés de l'humulone	55
3. Action de l'humulone sur le cyprin doré	56
4. Conclusion	57
b) Lupulone	57
1. Propriétés de la lupulone	57
2. Action de la lupulone sur le cyprin doré	57
3. Conclusion	58
c) Etude de l'huile essentielle de lupulin et de l'eau distillée de lupulin	58
1. Mode de préparation	58
2. Tableau synoptique des préparations effectuées	59
3. Action sur le cyprin doré	59
4. Conclusion	61
7. <i>Tableau résumé de l'action du lupulin sur Carassius Auratus (cyprin doré)</i>	61
8. <i>Mise en évidence d'un alcaloïde</i>	62

B. INFLUENCE DU TEMPS SUR LES PRÉPARATIONS SÉDATIVES DE LUPULIN

1. <i>Action sur le cyprin doré</i>	63
2. <i>Comparaison des résultats obtenus à deux ans d'intervalle</i>	65
3. <i>Conclusion</i>	65

C. RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE L'ACTION PHARMACOLOGIQUE DU LUPULIN ET SON AGE DE CONSERVATION

1. <i>Essais préliminaires</i>	65
2. <i>Discussion</i>	68
3. <i>Préparation de « décoctions »</i>	68
4. <i>Action sur le cyprin doré</i>	68
5. <i>Discussion</i>	71

	Pages
6. Détermination de la quantité optimum de lupulin par litre de décoction . .	72
7. Interprétation des résultats	73
8. Détermination de la solubilité du lupulin dans l'eau bouillante	76
a) Méthode utilisée	77
D. DISCUSSION GÉNÉRALE	78
E. CONCLUSIONS GÉNÉRALES	84
F. RÉSUMÉ	88
G. INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	88

TABLE DES GRAPHIQUES

Graphique I	46
Graphique II	58
Graphique III	71
Graphique IV	72
Graphique V	74
Graphique VI	75

